

UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
SEDE ARAGUA



***Determinación de la Infección por Brucella en Individuos
Ocupacionalmente Expuestos a Ganado Caprino en Municipios
del Estado Falcón***

Trabajo de Investigación
presentado como requisito
para ascender a la categoría
de Profesor Asistente

Prof (a). Bethelgeuse Sibrian Rodríguez

Maracay, Junio de 2008

UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
SEDE ARAGUA

***Determinación de la Infección por Brucella en Individuos
Ocupacionalmente Expuestos a Ganado Caprino en Municipios
del Estado Falcón***

Trabajo de Investigación
presentado como requisito
para ascender a la categoría
de Profesor Asistente

Prof (a). Bethelgeuse Sibrian Rodríguez
Tutor Científico: Prof. Clara Nancy Gutiérrez

Maracay, Junio de 2008

AGRADECIMIENTOS

A Dios por brindarnos la oportunidad de ser y emprender el sueño que hoy es realidad.

A la Universidad de Carabobo Sede Aragua, por permitirme vivir y seguir creciendo en ella a nivel docente y profesional, intelectual y personal.

Al Departamento de Microbiología de la Universidad de Carabobo Sede Aragua por su invaluable apoyo brindado en pro de la realización de este trabajo.

A todos los trabajadores, médicos y técnicos agropecuarios del estado Falcón que colaboraron por su excelente capacidad profesional e interés demostrado durante la parte experimental del presente trabajo.

A la profesora Clara Nancy Gutiérrez, por haber aceptado la tutoría de esta investigación, brindando su apoyo, tiempo, consejos y calidad humana.

A los profesores José Luis Cáceres, Ana Vásquez de Cedeño y Vilma Llovera, quienes desinteresadamente colaboraron cada día en la realización de este trabajo; más que su asesoría se valora su Apreciada Amistad.

A la profesora María Chacón, por su apoyo incondicional puesto de manifiesto durante la realización del presente trabajo.

... Mi Agradecimiento Sincero y Honesto

DEDICATORIA

A Dios Padre Todopoderoso y creador del universo, quién a iluminado mi camino, pensamiento y acciones, haciéndolos seguros y triunfantes.

A mi Angelito de la Guarda por nunca abandonarme y brindarme siempre su guía en todo momento.

A mis padres José y Carmen, quienes me han dedicado su amor, paciencia y sabiduría para instalar los valores espirituales, éticos y morales necesarios para transitar por el camino del bien y el éxito. Los Quiero mucho...

A mis hermanos Ben Haid y Ben Jamìn, quienes son el pilar en el que se sustentan mis esfuerzos, por hacerme crecer personalmente cada día, mi apoyo moral y mi vida. Estoy orgullosa de tenerlos como hermanos...

A mi abuela Ramona...que Dios la tenga en su cobijo y por acompañarme con su presencia espiritual y a la que dedico con todo mi corazón este trabajo por ser una de las personas más importantes e influyentes en mi vida.

A mi amiga Irene, por brindarme y demostrarme cada día el valor más preciado "La Amistad".

A mis Ángeles Anónimos quienes a través de sus palabras dulces, sus miradas tiernas, sus manos cálidas y sus enormes abrazos llenos de Amor y Paz lograron llenar mi ser de Fortaleza cuando mi espíritu más lo necesito. Sin ustedes no hubiera podido cumplir parte de mi misión, ni de este inmenso sueño...Gracias a Todos.

INDICE GENERAL

	PP
RESUMEN.....	v
AGRADECIMIENTO.....	ix
DEDICATORIA.....	xi
CAPITULO I	
INTRODUCCIÒN.....	1
1.1 Objetivos.....	6
1.1.1 General.....	6
1.1.2 Específicos.....	6
CAPITULO II	
MARCO TEÒRICO.....	7
2.1 Bases Teóricas.....	7
2.1.1. Historia y Taxonomía.....	7
2.1.2 Generalidades.....	10
2.1.2.1 Morfología y Fisiología.....	11
2.1.2.2 Estructura Antigénica.....	13
2.2 Patogenia e Inmunidad.....	14
2.3 Manifestaciones Clínicas.....	18
2.3.1 Infección en Humanos.....	18
2.3.2 Infección en Animales.....	21
2.4 Epidemiología.....	23
2.5 Diagnóstico de Laboratorio.....	24
2.5.1 Métodos Directos.....	25
2.5.2 Métodos Indirectos.....	27
2.5.3 Métodos Moleculares.....	30
2.6 Tratamiento, Prevención y Control.....	32
2.7 Antecedentes.....	35
CAPITULO III	
MARCO OPERACIONAL.....	39
3.1 Tipo de Investigación.....	39
3.2 Población y muestra.....	39
3.3 Técnica e Instrumentos de recolección de datos.....	40
3.4 Técnicas de Análisis de las Muestras biológicas.....	41
3.4.1 Pruebas Serológicas.....	41
3.4.1.1 Preparación antigénica.....	41
3.4.1.2 Controles (positivo y negativo).....	41
3.4.1.3 Prueba de Aglutinación en Placa (PAP).....	42
3.4.1.4 Prueba de Aglutinación en Tubo (PAT).....	42
3.4.1.5 Prueba de 2 – Mercaptoetanol (2-ME).....	43
3.4.1.6 Prueba de Card Test (CT).....	44
3.4.1.7 Prueba de Inmunoensayo Enzimático (ELISA) Modalidad	44
Indirecta.....	
3.4.2 Análisis de Datos.....	46
CAPITULO IV	
RESULTADOS.....	47
CAPITULO V	
DISCUSIÒN.....	56
CAPITULO VI	
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	65
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
ANEXOS	74

LISTAS DE FIGURAS

PP

1. Género <i>Brucella</i> . Coloración de Gram.....	11
2. Crecimiento de <i>Brucella</i> en Agar 5% de sangre ovina.....	26
3. Distribución de las Densidades Ópticas para la Obtención del Punto de Corte de IgG humana usando Sueros Controles Negativos..	49
4. Distribución de las Densidades Ópticas para la Obtención del Punto de Corte de IgM humana usando Sueros Controles Negativos..	49
5. Distribución de las Densidades Ópticas para la Obtención del Punto de Corte de IgG Caprino usando Sueros Controles Negativos..	51

LISTAS DE TABLAS

PP

1. Métodos Indirectos para el Diagnóstico de Brucelosis.....	29
2. Muestras sèricas humanas y caprinas recolectadas en los diferentes municipios del Estado Falcón.....	40
3. Número de Individuos y Ganado Caprino en Explotaciones del estado Falcón.....	47
4. Distribución de Individuos en Alto Riesgo de Contraer Brucelosis de Acuerdo a su Actividad Ocupacional.....	48
5. Resultados de la Serología para el Diagnóstico de Brucelosis Humana.....	50
6. Resultados de las Muestras de la Serología para el Diagnóstico de Brucelosis Caprina.....	52
7. Resultados entre las Personas Serológicamente Positivas y presencia de Brucelosis en el Ganado Caprino.....	53
8. Pruebas Serológicas Empleadas para la determinación de Brucelosis Humana y Presencia Total de Anticuerpos.....	53
9. Sintomatología Sugestiva de Brucelosis en Individuos Serológicamente Positivos del estado Falcón.....	54
10. OR Estimado para Actividad Ocupacional y Presencia de Anticuerpos en Brucelosis Humana del estado Falcón.....	55
11. Distribución del Porcentaje de Positividad en Humanos y Caprinos en las Explotaciones del estado Falcón.....	55

Universidad de Carabobo
Escuela de Bioanálisis
Sede Aragua

Determinación de la Infección por *Brucella* en Individuos Ocupacionalmente
Expuestos a Ganado Caprino en Municipios del Estado Falcón

Autor: Prof. Bethelgeuse Sibrian R

Tutor Científico: Prof. Clara Nancy Gutiérrez

Resumen

La Brucelosis tiene gran repercusión en la salud de la población, especialmente en el grupo económicamente activo dedicado a la explotación del ganado caprino. En Venezuela, estudios en grupos ocupacionalmente expuestos, reportan la presencia de personas positivas a la enfermedad a nivel de mataderos y granjas. El estado Falcón, es una región de cría de ganado caprino y actualmente se ve con preocupación que en ciertas zonas se están presentando marcadores serológicos positivos en caprinos y humanos. A fin de abordar el gran problema de salud pública que implica esta infección se planteó determinar Brucelosis en individuos ocupacionalmente expuestos a ganado caprino, establecer la presencia de anticuerpos anti *Brucella* en humanos y caprinos, relacionar las personas serologicamente positivas y la presencia de Brucelosis en estos animales, relacionar la sintomatología sugestiva de Brucelosis y presencia de anticuerpos y determinar la asociación entre actividad ocupacional y la presencia de anticuerpos para Brucelosis humana. Se evaluaron 442 muestras séricas, de las cuales 340 fueron caprinos y 102 de humanos. Se aplicaron distintas pruebas serológicas (Prueba de Aglutinación en Placa, Prueba de Aglutinación en Tubo, Card Test, Prueba de 2-Mercaptoetanol y ELISA indirecto). Se detectó la presencia de anticuerpos anti *Brucella* en individuos de alto riesgo por estar en contacto con ganado caprino. Actividades ocupacionales relacionadas demostraron que los individuos independientemente de su ocupación tienen la misma probabilidad de producir anticuerpos para Brucelosis humana. Para el ganado caprino se obtuvo un valor de 7,9%, evidenciándose la coincidencia entre animales e individuos positivos en la misma área. Del total de trabajadores positivos, se corroboró un alto porcentaje de síntomas sugestivos de Brucelosis. En este sentido, la Brucelosis caprina genera enfermedad en el humano; el reforzar la vigilancia y control de la infección en animales, garantizaría la no existencia de esta en humanos.

Palabras claves: Brucelosis, Ocupación, Caprinos, Alto Riesgo.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La Brucelosis es una zoonosis que afecta una gran variedad de animales domésticos y silvestres. Es una enfermedad presente a nivel mundial y todavía endémica en los países subdesarrollados especialmente de América Latina (Acha y Szyfres, 1986).

Con base a la marcada preferencia que expresan estas bacterias por el huésped animal se tiene que: *Brucella abortus* se asocia más con ganado bovino; *Brucella melitensis* con caprinos y ovinos, *Brucella suis* con suinos, *Brucella canis* con caninos, *Brucella ovis* con ovinos y *Brucella neotomae* con roedores (*ob.cit*).

El hombre es muy susceptible a las especies *B. melitensis*, *B. abortus* y *B. suis*, ya que se considera que *Brucella ovis* y *Brucella neotomae* se restringen sólo a ciertos hospedadores por su baja virulencia. El riesgo que corre cualquier individuo de contraer la enfermedad y la severidad del padecimiento, está determinada por la exposición o contacto frecuente con estos microorganismos así como el estado nutricional e inmunológico, la vía de infección y el tamaño del inóculo (López Merino., 1999b).

En cuanto a la vía de infección se considera que la más eficiente es el contacto con los productos del aborto del animal; además las bacterias pueden penetrar al hombre a través de la conjuntiva y/o piel maltratada, cortada o reblandecida. Igual magnitud de riesgo representan las vísceras, sangre y excretas de animales enfermos, que constituyen la forma de infección más común para veterinarios, ordeñadores así como trabajadores de mataderos. Por otra parte la vía digestiva es la generadora del mayor número de casos humanos reportados en varios países, donde el consumo de leche y sus derivados sin pasteurizar; es una práctica muy común y ampliamente extendida (López Merino y cols., 1996).

Brucella melitensis es la especie que más se notifica como agente causal de la enfermedad en humanos por ser la que más se asocia con enfermedad aguda severa y casos crónicos de difícil solución. En bovinos es un problema grave, por el gran volumen de leche infectada que es producida por el animal enfermo y por la contaminación que se produce en el medio ambiente ya que un sólo aborto puede generar alrededor de 1010 bacterias/ml (López Merino, 1999b).

Se debe sospechar de Brucelosis humana en todos aquellos individuos que presenten síntomas como fiebre, escalofríos, dolor de cabeza, sudoración nocturna, malestar general, debilidad; que provengan de zonas endémicas, que hubiesen consumido productos lácteos no pasteurizados o de origen dudoso y/o que hayan tenido contacto estrecho con animales de esas zonas (López Merino y cols., 1996).

Esta enfermedad tiene gran importancia por su repercusión en la salud de la población especialmente del grupo económicamente activo en el impacto de la economía del país debido a los altos costos para la recuperación de los enfermos y la baja productividad del recurso humano por la incapacidad física, temporal o permanente; además de las pérdidas ocasionadas en la economía pecuaria al incidir la enfermedad en el ganado bovino, ovino, caprino y porcino; animales que constituyen fuente de proteína para la alimentación de la población (Guillén y Navarro., 1999).

Estudios afirman que profesiones (dada su actividad permanente o temporal) tales como trabajadores de mataderos ò fincas, ganaderos, veterinarios, pastores entre otros, constituyen personal de alto riesgo a contraer la enfermedad asociado al contacto directo con el ganado como también indirectamente con el consumo de alimentos lácteos no pasteurizados. La transmisión de persona a persona es infrecuente y en algunos casos se ha comunicado la transmisión transplacentaria (Agasthya y cols., 2007; Reyes y Villarroel, 2006).

En Venezuela, se han realizado estudios en grupos ocupacionalmente expuestos y en alto riesgo, en donde se ha reportado la presencia de reactores a nivel de mataderos y granjas de cerdos, indicando infecciones crónicas o

exposiciones repetidas al microorganismo. Divo (1968) en el estado Carabobo, reportó un índice de positividad del 5,71% con una incidencia del 2,73% en el personal expuesto a la infección.

Vásquez y Sánchez (1993) realizaron estudios serológicos en individuos ocupacionalmente expuestos en los estados Zulia y Aragua, evidenciando una prevalencia que oscilaba entre 2,3% hasta un 24%

En un estudio seroepidemiológico realizado en el estado Mérida por Peña y cols., (1995) reportaron en individuos una positividad del 10,86% en la zona urbana y 7,65% en la zona rural.

Sosa y cols., (1998) demostraron una prevalencia en trabajadores de granjas porcinas de un 24% y una presencia de sugestiva, clínicamente de Brucelosis en un rango entre 22% y 34%.

El estado Falcón, es una región de cría de ganado caprino en donde estudios realizados por Lord (1987) reportan un 53,29% de reactores en caprinos, de los cuales 34,38% fueron positivos, 11,17% dudosos y 7,73% negativos.

A pesar de ello en el estado Falcón se conoce muy poco acerca de la epidemiología y de la prevalencia de la infección en humanos. Actualmente se ha visto con preocupación que en dichas zonas se están presentando marcadores serológicos positivos en ganado caprino y siendo esta especie reservorio de *Brucella melitensis*, podría generarse un problema de salud en el humano por la severidad de la infección producida por esta especie, lo que hace preguntar seriamente que podría estar sucediendo.

Estos datos permiten reflejar que en el país está presente la enfermedad y probablemente hay muchos casos inaparentes, incorrectamente diagnosticados junto a casos con síntomas clínicos, serología positiva y ocupacionalmente

expuestos a la infección. Países como Colombia muestran de igual manera subnotificaciones y subregistros de casos de Brucelosis humana, debido entre otras causas, a las formas inespecíficas en que se presenta la enfermedad, diagnósticos imprecisos, problemas en la captación de casos a nivel local y que solo un porcentaje de los enfermos acuden a los centros de salud (Osejo y cols., 2005).

De igual forma, la Brucelosis da origen a manifestaciones de gran polimorfismo, por lo cual, debe ser incluida en el diagnóstico diferencial de una variedad de cuadros clínicos (Reyes y Villarroel, 2006).

Por lo antes planteado se realizó un estudio de determinación de anticuerpos anti- *Brucella* en individuos ocupacionalmente expuestos por el manejo y beneficio de ganado caprino en municipios del estado Falcón, con el fin de evaluar la presencia de una posible infección en humanos y su relación con los caprinos.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar Brucelosis en individuos ocupacionalmente expuestos a ganado caprino en municipios del estado Falcón.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Establecer la presencia de anticuerpos anti *Brucella* en humanos
- Establecer la presencia de anticuerpos anti *Brucella* en ganado caprino
- Relacionar las personas serológicamente positivas y la presencia de Brucelosis en el ganado caprino.
- Establecer la relación entre la sintomatología sugestiva de Brucelosis y la presencia de anticuerpos.
- Determinar la asociación entre la actividad ocupacional y la presencia de anticuerpos para Brucelosis Humana.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 BASES TEÓRICAS

2.1.1 HISTORIA Y TAXONOMÍA

Malestar, anorexia, fiebre y profunda debilidad muscular caracterizaron a una enfermedad debilitante reconocida por primera vez por Marston en 1861 como “fiebre gástrica remitente”. De igual forma fue referida con otros nombres como: Fiebre del Mediterráneo, Fiebre de Malta y Enfermedad de Bangs (Aleixo y cols., 1999). El microorganismo responsable, *Micrococcus melitensis*, fue aislado por primera vez en 1887 por Sir David Bruce. El microorganismo deriva su nombre de Melita (miel), nombre romano de la isla de Malta donde fue reconocida la enfermedad clínica por Hughes, quién en 1897 alteró su designación por el término “fiebre ondulante”. Los conocimientos adquiridos acerca de la Brucelosis fueron resultado directo de la morbilidad observada en las fuerzas armadas de Gran Bretaña que utilizaron la isla de Malta como base militar durante la primera parte del siglo XX (Joklik y cols., 1994).

Otros autores como Demarco y Howard (1722-1787), Fauverge (1798-1800) Cleghorn (1744-1749), Heastie (1825-1828), Burnet (1800-1810), Hennen (1816-1825) y Davy (1833-1835) habían descrito la enfermedad antes de Marston. De acuerdo a Hughes (1897), la enfermedad había sido caracterizada inicialmente por Hipócrates (460 A.C) (Madkour, 1989).

El análisis de los nucleótidos del gen 16S ribosomal (16S rRNA), la composición lipídica y ciertos aspectos de su fisiología y biología general sitúan a

Brucella dentro del Reino *Proteobacteria*, Clase *Rodospirilla*, Orden *Rizobial*, Familia *Brucellaceae* (SAGARPA, 2007).

El reconocimiento de infecciones por otros miembros del género *Brucella* ocurrió en forma independiente. Nocard, en 1862, fue el primero en reconocer la presencia de bacterias entre las membranas fetales y la pared del útero de una vaca preñada, pero correspondió a Bang, un veterinario danés aislar el microorganismo *Brucella abortus* (Madkour, 1989). A pesar que el aborto epidémico del ganado vacuno era conocido con anterioridad en el estado de Louisiana en Estados Unidos, la bacteria causante, *Brucella abortus*, no fue aislada hasta 1895 cuando el veterinario Bernhard Bang en Copenhague la obtuvo a partir de productos de abortos de ganado vacuno (SAGARPA, 2007). En un informe de sus hallazgos en 1897, Bang relacionó los microorganismos con abortos infecciosos de animales. El tercer miembro del género fue identificado en 1914, cuando Traums aisló *Brucella suis* de un cerdo prematuro (Joklik y cols., 1994).

No se conoció la relación de estos tres microorganismos hasta que Alice Evans, una microbióloga americana quien trabajando para la Dairy División of the Bureau of Animal Industry, observó la estrecha relación bacteriológica y serológica entre *Micrococcus melitensis* y *Brucella abortus* (*ob.cit*).

El nombre de “Brucelosis” fue propuesto por Alice Evans, en 1918 para reemplazar “Fiebre de Malta u ondulante” como fue comúnmente conocida hasta ese tiempo (Madkour, 1989). Como resultado de sus observaciones, se reconoció el género *Brucella*, denominado así en honor a sir David Bruce. El diagnóstico serológico de la Brucelosis comenzó en 1897 cuando Almroth Wright y colaboradores describieron una técnica de seroaglutinación en tubos capilares útil para el diagnóstico. Esta técnica constituye el antecedente del método actual de seroaglutinación en tubo denominado seroaglutinación de Wright en honor de su descubridor (SAGARPA, 2007).

Desde un punto de vista epidemiológico esta enfermedad se presenta como una zoonosis de extraordinaria complejidad debida a la variedad de especies de *Brucella* implicadas y a las características epidemiológicas que presenta cada una de ellas. Hasta hace pocos años se reconocían 6 especies diferentes de *Brucella* subdivididas en 15 biovariedades que se distinguían entre sí por algunas de sus propiedades bioquímicas y culturales. Así, clásicamente se describían *Brucella melitensis* (3 biovariedades), *Brucella abortus* (7 biovariedades), *Brucella suis* (5 biovariedades), *Brucella neotomae*, *Brucella ovis* y *Brucella canis*. Sin embargo, los estudios de hibridación del genoma y de secuenciación de los genes 16S rRNA de *Brucella* han demostrado una homología superior al 95% entre las diferentes especies. Esta homología genética ha llevado a agrupar desde el punto de vista taxonómico a todas las especies de *Brucella* dentro de la única especie *Brucella melitensis* y a considerar a cada una de las antiguas especies como biovariedades de la especie *Brucella melitensis*. Así, la nomenclatura propuesta para las antiguas especies y biovariedades de *Brucella* sería: *Brucella melitensis* biovar *melitensis* 1, *Brucella melitensis* biovar *melitensis* 2, *Brucella melitensis* biovar *melitensis* 3, *Brucella melitensis* biovar *abortus* 1, etc. A pesar de ello y con objeto de evitar confusiones se mantiene la terminología antigua excepto cuando se trata de nominarlas con fines taxonómicos (*ob.cit*).

Es importante destacar la existencia de dos nuevas especies de *Brucella* procedentes de diferentes mamíferos marinos entre los que se encuentran delfines, marsopas, focas, etc., y provisionalmente llamadas *Brucella pinnipediae* y *Brucella cetaceae* (Pappas y cols., 2005)

Inicialmente se pensaba la existencia de una sola especie marina y se había propuesto el nombre a esta especie: *Brucella maris* (García, 1999). Los estudios genómicos llevados a cabo sobre estas cepas y las especies clásicas terrestres demuestran que las cepas de *Brucella* de origen marino son diferentes a las especies clásicas. Esta especie fue aislada en el año de 1994; y además es

considerada eventualmente patogénica para el hombre (SAGARPA, 2007; Castro y cols., 2005).

2.1.2 GENERALIDADES

La Brucelosis es una zoonosis que afecta una gran variedad de animales domésticos y silvestres. El hombre huésped accidental y terminal, la adquiere de modo directo o indirecto a partir de las fuentes naturales. Es producida por una bacteria Gramnegativa, intracelular facultativa que presenta una elevada tendencia a producir infecciones crónicas tanto en el hombre como en los animales. Actualmente, la brucelosis se mantiene como la principal zoonosis a nivel mundial y es una de las primeras causas de enfermedad en el hombre y en los animales domésticos (López Merino y cols., 1996; SAGARPA, 2007).

La Brucelosis también plantea barreras a nivel del intercambio animal y sus productos, perjudicando seriamente el desarrollo socioeconómico, especialmente del sector más vulnerable de la población. En humanos es también llamada Melitococcia, fiebre ondulante, fiebre de Malta, fiebre del Mediterráneo. En animales, aborto infeccioso, aborto contagioso, aborto epizootico y enfermedad de Bang en los bovinos (Candelo de Arriojas, 2004).

2.1.2.1 Morfología y Fisiología

Los miembros del género *Brucella* son bacilos cortos o cocobacilos Gramnegativos, que se colorean mal con la coloración convencional de Gram, inmóviles, no esporulados, sin cápsula y aerobios estrictos (Forbes y cols., 2004) (figura 1). Con un tamaño que varía de 0,5 a 0,7 por 0,6 a 1,5 μm . Crecen lentamente y requieren medios complejos para el aislamiento primario. Medios tales como el agar suero- dextrosa o agar- tripticasa son satisfactorios para el crecimiento ó aislamiento de esta bacteria (Joklik y cols.,1994). Son catalasa y oxidasa positivos, no atacan la gelatina ni modifican la leche y en general no fermentan los azúcares (Castro y cols., 2005).

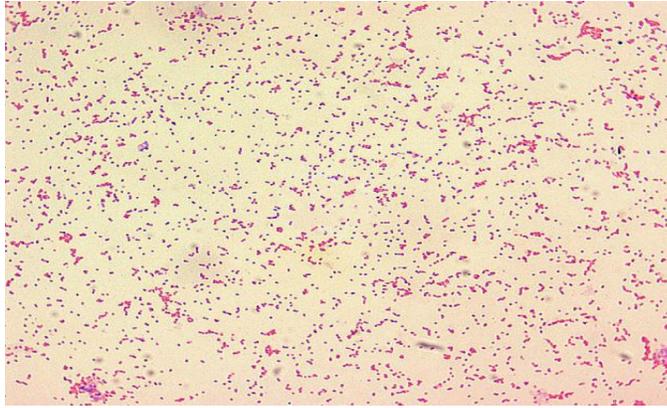


Figura 1. Género *Brucella*. Coloración de Gram

http://www.sfcddcp.org/UserFiles/Image/brucella_organisms.jpg

Tienen un metabolismo oxidativo, basado en la utilización de nitratos como aceptores de electrones. A diferencia de muchas bacterias, su genoma está constituido por dos cromosomas circulares y carece de plásmidos (*ob.cit*).

Los miembros de este género comprenden un grupo genético estrechamente entrelazado según lo definen estudios de hibridación de ADN. La diferenciación de las tres especies más comunes de *Brucella* se basa en diferencias cuantitativas en diversas pruebas serológicas. La necesidad de incremento de CO₂ para su crecimiento es característica de *Brucella abortus*. La capacidad de producir hidrógeno sulfurado (H₂S) durante un lapso de cuatro a cinco días es más típica de *Brucella abortus* o *Brucella suis*. *Brucella melitensis* habitualmente crece en presencia de fucsina básica y tionina, mientras que la tionina inhibe el crecimiento de *Brucella abortus* y la fucsina básica, el de *Brucella suis* (Joklik y cols., 1994).

Dentro de cada una de estas tres especies de *Brucella*, se han reconocido cierto número de cepas o biotipos con base en éstas y otras propiedades bioquímicas adicionales. Son nueve los biovares reconocidos para *Brucella abortus*, tres para *Brucella melitensis* y cinco para *Brucella suis*. Aunque se conocen otras variantes entre las especies, éstas no han sido diferenciadas dentro de los biovares (Castro y cols., 2005).

Características de Cultivo

Con base en el aspecto de las colonias obtenidas en medio sólido, las diferentes especies de *Brucella*, se clasifican habitualmente como lisas (S) o rugosas (R). Dentro de las primeras se encuentran *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* y *B. neotomae* y dentro de las segundas *B. ovis* y *B. canis* (Castro y cols., 2005).

Si bien las especies de *Brucella* crecen en agar sangre y chocolate, se recomiendan los medios suplementados, como agar *Brucella* o algún tipo de infusión base para las muestras que no sean sangre. El agregado de suero calentado de caballo o conejo al 5% incrementa el crecimiento en todos los medios. Se incuba en atmósfera humidificada con CO₂ al 5 a 10% y durante 3 semanas antes de descartarse como negativo. Las colonias aparecen pequeñas, convexas, lisas, translúcidas, no hemolíticas y amarillo pálido y opalescentes después de por lo menos 48 horas de incubación; aunque pueden tornarse de color castaño con el envejecimiento (Forbes y cols., 2004).

Vale destacar, que el aspecto que adquieren las colonias se debe a la expresión del lipopolisacárido (LPS) en la superficie bacteriana. Las cepas de *Brucella* en fase lisa, son las más virulentas y su ultraestructura es semejante a la de algunas bacterias (*Yersinia enterocolitica*, *Salmonella Iandau*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Escherichia coli*), aunque presenta ciertas diferencias en las características de su membrana externa (Castro y cols., 2005).

2.1.2.2 Estructura Antigénica

Brucella abortus, *Brucella melitensis* y *Brucella suis* se observan como cepas lisa, en la naturaleza. La propagación de los microorganismos en el laboratorio da como resultado un cambio en la antigenicidad del microorganismo, con alteraciones visibles en la morfología de las colonias y una reducción en la virulencia para los animales de laboratorio. La hipótesis actual de la estructura antigénica de estas tres especies reconoce dos determinantes antigénicos: A (*B. abortus*) y M (*B. melitensis*), presentes en el complejo proteína lipopolisacárido.

Hay cierta reactividad antigénica cruzada de las brucelas con otros microorganismos, como *Yersinia enterocolítica*, *Francisella tularencis* y *Vibrio cholerae* (Joklik y cols.,1994).

Se ha señalado al complejo s-LPS (Lipopolisacáridos) de la superficie externa de *Brucella abortus* como principal componente antigénico involucrado en las pruebas serológicas usadas para el diagnóstico de brucelosis, sin embargo existen otros componentes antigénicos cuya significación biológica no ha sido demostrada. El LPS está constituido por tres regiones: el polisacárido O, específico (región I), el polisacárido del “core” (región II) y el lípido A (región III) insertada en la pared celular. La especificidad serológica reside en la región I y la toxicidad en la región II (Shurig y cols., 1978). Los lipopolisacáridos estimulan una extraordinaria gama de respuestas del huésped, o quizás podría decirse que una amplia gama de respuestas se desencadenan ante la presencia de los LPS (Mims y cols., 1995).

2.2 PATOGENIA E INMUNIDAD

Al igual que *Francisella tularensis*, *Brucella* es un parásito intracelular del sistema reticuloendotelial capaz de evadir la respuesta inmune humoral frente a la infección. La supervivencia intracelular puede ser prolongada a menos que se desarrolle inmunidad celular específica. La supervivencia está mediada por inhibición de la desgranulación de los leucocitos polimorfonucleares. *Brucella melitensis* es la especie con mayor capacidad para resistir el efecto bactericida del suero y de los fagocitos, de acuerdo con la mayor virulencia de esa especie (Murray y cols., 1997).

Los microorganismos pueden ingresar a través de la conjuntiva y la piel maltratada, cortada o reblandecida. De igual magnitud las vísceras, sangre y excretas de animales enfermos representan la forma de infección más común para veterinarios, ordeñadores y trabajadores de mataderos (López Merino y cols.,1996).

La infección por vía respiratoria constituye una ruta de infección importante según la ocupación del individuo, por la inhalación de bacterias vivas provenientes del material altamente contaminado: excretas secas, pelo, polvo de corrales y aerosoles. La vía digestiva es la generadora del mayor número de casos humanos reportados en varios países donde el consumo de leche y sus derivados sin pasteurizar, es una práctica muy común y ampliamente extendida (*ob. cit*).

En la infección natural tanto en el hombre como animales, hay una respuesta inicial de anticuerpos IgM a la cual sigue una respuesta de anticuerpos IgG e IgA. Los anticuerpos en los pacientes pueden persistir durante muchos meses o años, por lo que es necesario un aumento significativo del título para diagnosticar la enfermedad actual. Se puede establecer un diagnóstico presuntivo por el aumento de cuatro veces el título de 160 o superior (Murray y cols., 1997).

Las bacterias pasan desde el punto de entrada a los ganglios linfáticos locales y regionales, hasta alcanzar el conducto torácico y por tanto la sangre (fase septicémica). Después infectan las células del sistema reticuloendotelial (hígado, bazo, médula ósea, tejido linfoide). En esas células, en los monocitos y los macrófagos, es donde se libra la batalla entre el hospedero y el parásito. El resultado consiste en una reacción inflamatoria (granulomatosa) con células epiteloides y gigantes, necrosis central y fibrosis periférica. Muchas veces la infección tiene carácter subclínico (Mims y cols., 1995).

Quizás de manera asociada a la forma de penetración, la capacidad de la bacteria para evadirse del fagosoma y desplazarse hacia el retículo endoplásmico, en donde se va replicar, está muy estrechamente relacionada con su virulencia. Una observación importante ha sido el hecho de que aparentemente *Brucella* puede evitar la fusión del fagosoma con el lisosoma mediante un mecanismo no conocido, y durante su estancia en el fagocito no estimula su destrucción metabólica relacionada con la generación de metabolitos del oxígeno, pasos necesarios para la muerte bacteriana dentro del fagocito (López, 1999).

El ingreso de *Brucella* en el organismo induce la activación de los mecanismos de defensa que se inician con la participación de algunos

componentes de la inmunidad innata, como el complemento (C), los neutrófilos y los macrófagos. Existen controversias en cuanto a la capacidad que posee el LPS de este microorganismo de activar la vía alterna del C, sin embargo, la activación de la vía clásica puede iniciarse con la presencia de bajas concentraciones de IgM e IgG anti-LPS, lográndose de esta forma la lisis bacteriana (Castro y cols., 2005).

Los neutrófilos son las primeras células del huésped que se ponen en contacto con este microorganismo. La opsonización de las bacterias por anticuerpos y complemento facilita su fagocitosis. Para que se produzca la muerte de las bacterias intracelulares, es necesaria la desgranulación de los neutrófilos con la consiguiente liberación de mieloperoxidasa. Sin embargo, se ha demostrado que este género bacteriano posee mecanismos que inhiben esta desgranulación y evitan así su destrucción (*ob.cit*).

El LPS es considerado un antígeno T independiente, capaz de activar a los linfocitos B (LB) sin la participación de los linfocitos T colaboradores. Los primeros anticuerpos que se generan en el curso de una infección son de clase IgM, seguidos de IgG e IgA, dependiendo de la especie animal. Pueden aparecer, dentro de la clase IgG, anticuerpos bloqueantes o no aglutinantes, también llamados asimétricos, en especial en infecciones crónicas donde suelen alcanzar títulos elevados. Estos anticuerpos se diferencian de los anticuerpos completos en ciertas propiedades tanto *in vitro* como *in vivo*, la incapacidad de activar el complemento por cualquiera de las vías o dar adecuadas reacciones de aglutinación (Castro y cols., 2005).

López y Sánchez (1986), afirman que se han utilizado vacunas constituidas por bacterias completas poco virulentas que inducen una buena respuesta inmunitaria celular *in vitro*, y un estado de protección contra cepas virulentas, por lo menos en animales. Por razones obvias, en humanos no es factible probar la eficacia de las vacunas, por lo que se ha tenido que reducir a estudios *in vitro* para valorar su poder protector.

En los animales después de su vacunación las IgM se detectan al quinto día alcanzando sus valores máximos trece días después aproximadamente, pudiendo persistir por largo tiempo. Los anticuerpos de clase IgG se detectan simultáneamente o pocos días después y sus valores más altos se observan de 28-42 días más tarde para desaparecer a los seis meses, mientras que en la infección natural las IgG persisten por mucho tiempo (Acha y Szyfres, 1986).

2.3 MANIFESTACIONES CLÍNICAS

2.3.1 Infección en humanos

La Brucelosis humana presenta manifestaciones clínicas muy variadas, siendo muchas veces asintomática hasta una enfermedad grave y debilitante (Reyes y Villarroel, 2006; Forbes y cols., 2004). La brucelosis humana es una infección sistémica, que se ubica en órganos ricos en elementos del sistema fagocítico mononuclear, como ganglios linfáticos, bazo, hígado y médula ósea. Ocasionalmente se le puede encontrar localizada solamente en un órgano o tejido del sistema fagocítico mononuclear (López, 1999).

Los síntomas de Brucelosis aguda comienzan tras un período de incubación de una a tres semanas, con malestar general, fiebre, sudoración profusa, dolores musculares y debilidad general. El ascenso y descenso de la fiebre (ondulante) se observa en una minoría de pacientes. Puede detectarse un aumento de tamaño de los ganglios linfáticos y es posible el desarrollo de hepatitis (Mims y cols., 1995).

En los niños el cuadro clínico suele ser autolimitado, los síntomas son más inespecíficos y se manifiestan dos a cuatro semanas después de comenzar la infección y, generalmente, existe el antecedente de exposición a alimentos contaminados (Reyes y Villarroel, 2006).

Brucella melitensis, de mayor virulencia en el hombre, produce síntomas característicos como malestar general, escalofrío, sudoración, fatigas, debilidad, mialgias, pérdida de peso, dolores articulares y tos seca. Más del 90% de los pacientes presentan fiebre intermitente con variaciones diurnas características, pero solo el 10% al 20% tienen esplenomegalia o linfadenopatía palpable. Los pacientes pueden presentar trastornos neuropsiquiátricos debilitantes (Acha y Szyfres, 1986).

En un estudio realizado por Kalelioglu y cols (1990), demostraron la existencia de abscesos cerebrales causados por *Brucella abortus* y *Staphylococcus aureus* en niños. Esta complicación es frecuente al menos en un 10% de los pacientes. Otra complicación aún más común de la brucelosis humana es infección en los huesos o articulaciones.

La artritis séptica y destructiva es la más severa de las manifestaciones clínicas causadas por *Brucella*. Presenta predilección por niños y pacientes jóvenes. La artritis séptica debido a Brucelosis puede ser sospechosa si esta asociada a contajes normales de glóbulos blancos y escasas elevaciones del volumen de sedimentación globular (VSG). El descubrimiento en el suero de aglutininas contra *Brucella* es esencial para el diagnóstico (Tuncer y cols., 1999).

Las lesiones de la médula ósea pueden evolucionar hacia la osteomielitis (Mims y cols., 1995). Las complicaciones neurológicas se presentan de tres formas diferentes: como un cuadro meníngeo de corta evolución; un segundo grupo muestra una evolución larga, con una presentación clínica más insidiosa, originando una enfermedad meningovascular, y el tercer grupo es el resultado de la inflamación meníngea crónica con escasa respuesta inflamatoria pero que deja secuelas irreversibles en el Sistema Nervioso Central (SNC) (Reyes y Villarroel, 2006).

La endocarditis causada por esta infección, afecta en un 50% de los casos las válvulas aórticas sanas; provocando un cuadro grave con una letalidad del 80%. La complicación gastrointestinal más común es la hepatitis, describiéndose casos de colecistitis apendicitis, pancreatitis, perforaciones del íleon, adenitis mesentérica, ascitis y granulomas hepáticos (Pappas y cols., 2005; Reyes y Villarroel, 2006).

En las mujeres no se produce aborto a diferencias de las vacas, cerdos y cabras infectadas. Esto se debe a la presencia en la placenta de estos animales de eritritol, azúcar que estimula la proliferación bacteriana. La placenta humana no contiene eritritol (Mims y cols., 1995).

El paciente se recupera, en general, tras unas pocas semanas o meses, pero puede desarrollar enfermedad crónica (duración superior a un año) con cansancio, dolores, ansiedad, depresión y a veces fiebre. Es muy rara en niños, observándose generalmente en adultos sobre 30 años de edad y se asocia a infección por *B. melitensis*. Son posibles las recaídas y remisiones. Las bacterias no se aíslan en ese estadio y la brucelosis crónica suele ser difícil de diagnosticar. Los títulos de aglutininas resultan, en general altos, pero los anticuerpos son menos relevantes que la inmunidad celular para este parásito intracelular (Mims y cols., 1995; Reyes y Villarroel, 2006).

Las secuelas de esta enfermedad son variables, éstas incluyen: hepatitis granulomatosa, artritis periférica, espondilitis, anemia, leucopenia, trombocitopenia, meningitis, uveitis, neuritis óptica, edema papilar y endocarditis (Centro para el Control y Prevención de Enfermedades [CDC], 1999).

En efecto, la duración de los síntomas por más de 30 días previos al diagnóstico, es el factor de riesgo más importante para desarrollar las formas focales de la enfermedad. El 30% del total de casos de brucelosis corresponden a lesiones del músculo esquelético. Las localizaciones más frecuentes en los adultos son la sacroileítis y la espondilitis, a diferencia de los niños donde las articulaciones afectadas corresponden a rodillas, codos y tobillos con compromiso monoarticular u oligoarticular (Pappas y cols., 2005; Reyes y Villarroel, 2006).

Entre otras formas focales de la enfermedad, se describen las genitourinarias (6 – 18%), ya sea como epididimitis u orquiepididimitis en el hombre; en la mujer se puede presentar como abscesos tubo-ováricos, abscesos pelvianos, salpingitis crónica, cervicitis y alteraciones del ciclo menstrual. Sobre el pulmón se pueden observar nódulos, adenopatías hiliares, neumonías lobares e incluso empiema. El compromiso renal puede estar dado por invasión directa de la bacteria, ocasionando cuadros de nefritis intersticial o por depósito de complejos inmunes, que comúnmente se asocian a endocarditis y originar una glomerulonefritis membrana proliferativa que se puede revertir al tratar la enfermedad (Reyes y Villarroel, 2006).

2.3.2 Infección en animales

Brucella abortus es el principal agente etiológico de la brucelosis bovina, *Brucella melitensis* es el agente etiológico de la brucelosis caprina u ovina, *Brucella suis* normalmente causa brucelosis en el cerdo y *Brucella ovis* a los ovinos. En los bovinos el síntoma principal de brucelosis es el aborto en el cual se expulsan fetos y placentas infectadas. También se presentan nacimientos prematuros o partos a término de terneros débiles o mortinatos (Schurig, 1999).

Cuando los animales se ven expuestos a la bacteria, la infección con *Brucella abortus* ocurre principalmente a través de la mucosa oral, respiratoria y conjuntival. Desde la mucosa, los microorganismos migran hacia los ganglios linfáticos que drenan el área de infección multiplicándose en estos últimos (*ob. cit.*).

La replicación es intracelular y ocurre especialmente dentro de los macrófagos. Desde los ganglios locales, *Brucella* se disemina vía sanguínea a varios órganos: ganglios linfáticos, hígado, bazo, ubre y en el caso de las hembras preñadas, el útero gestante produciendo una infección en la placenta y el feto. Esta infección conduce al aborto. Los animales también pueden excretar *Brucella* en la leche. En los toros, la bacteria se puede ubicar en los testículos y glándulas anexas causando varios grados de inflamación e infertilidad (*ob. cit.*).

Los caprinos y ovinos se infectan con *Brucella melitensis* de un modo similar a los bovinos. También se pueden observar higromas, artritis, espondilitis y orquitis. A diferencia de lo que sucede con las hembras de otras especies domésticas infectadas por *Brucella*, en las cabras la mastitis es común y en un hato puede ser el signo que llame la atención. Se pueden observar coágulos en la leche, así como pequeños nódulos en la glándula mamaria. En aquellos hatos con animales crónicamente infectados, los signos de la enfermedad son, en general, poco notables (Acha y Szyfres, 1986).

En la epididimitis del carnero por *Brucella ovis* el semen es el principal y quizás la única fuente de infección (*ob.cit.*). Las lesiones anatomopatológicas también resultan poco evidentes, a pesar de que con frecuencia se puede aislar el agente etiológico de un gran número de tejidos y órganos. La enfermedad causa inflamación en la cola del epidídimo induciendo a lesiones necróticas caracterizadas por granulomas espermáticos formados a partir de esperma trasvasado (Aldridge, 1999). La infección se transmite de un macho a otro por contacto rectal o prepusiano.

La transmisión puede producirse también a través de una hembra cuando un carnero infectado deposita su semen. En la hembra la infección es poco frecuente y cuando ocurre se contrae por vía sexual. No es rara la infección de los cabritos *in útero*, como tampoco durante el amamantamiento; en algunos la infección puede persistir. *Brucella ovis* persiste poco tiempo en la oveja y suele eliminarse antes del parto siguiente (Acha y Szyfres, 1986).

2.4 EPIDEMIOLOGÍA

Las zoonosis y las enfermedades transmisibles al hombre y a los animales representan una importante amenaza para la salud y el bienestar de la población

en todo el mundo. A pesar de los avances logrados en años recientes con las medidas de control de enfermedades y en la extensión de la cobertura de los servicios de salud, estas enfermedades siguen registrando altas tasas de incidencia en zonas urbanas, periurbanas y rurales en los países en desarrollo. Por extensión, tienen potencialmente un gran impacto en muchas economías nacionales cuyo comercio con el exterior y estabilidad dependen directamente de la confiabilidad de los alimentos exentos de enfermedades para la exportación. Por lo tanto, estas enfermedades, quizá más que ningún otro problema similar, ilustran la estrecha relación que existe entre la salud pública, el ambiente y el bienestar socioeconómico (Vásquez, 1998; Smits y Kadri, 2005).

La prevalencia y la incidencia reportada varían ampliamente de país a país. La brucelosis ovina o caprina por *Brucella melintensis* sigue siendo el principal problema en la región del Mediterráneo, oeste de Asia, partes de África y Latinoamérica (Corbel, 1997).

En un estudio publicado por Abu Shaqra (2000), se registró un total de 7842 casos de brucelosis humana desde Enero de 1988 a Diciembre de 1997 en la región de Jordan. Se encontró una relación entre la temporada de cría de ovejas y la ocurrencia de infección en los humanos. La más baja incidencia fue observada en 1988 con 16,7%, mientras que en 1991 se reportó 29,9%. Estos datos suministran aquellos casos notificados en Jordan, pero no reflejan la frecuencia actual de la infección para la fecha de publicación subestimando el grado de los casos.

Las condiciones primitivas en las que se desarrollan la explotación del ganado caprino, constituyen uno de los factores más importantes en el mantenimiento y difusión de la infección en América Latina (México, Perú, Argentina y probablemente Chile) y en resto del mundo. Las pautas de ocurrencia de la infección humana están dadas por la prevalencia de la infección en los reservorios animales. La infección por *Brucella abortus* y *Brucella suis* suelen

afectar mayormente a grupos ocupacionales, mientras que la causada por *Brucella melitensis* ocurre con mas frecuencia en la población general. La prevalencia mas alta en el hombre, se encuentra en los países con tasa elevadas de brucelosis por *Brucella melitensis*, en caprinos u ovinos o en ambas especies (Acha y Szyfres, 1986).

2.5 DIAGNOSTICO DE LABORATORIO

La Brucelosis humana ha sido clasificada en forma arbitraria en varias categorías: subclínica, subaguda, bacteriémica, aguda, recurrente, crónica entre otras. Dichos términos reflejan el espectro de las manifestaciones clínicas pero complican más el diagnóstico. La mayoría de los autores consideran sólo la fase aguda y la crónica aunque se acepta que un número importante de individuos es afectado por la Brucelosis asintomática o de síntomas leves y poco aparentes, no existiendo una definición en términos clínicos. Para establecer el diagnóstico de la Brucelosis en el hombre se debe tomar en cuenta la presencia de signos y síntomas compatibles con la enfermedad, antecedentes de tipo epidemiológico y estudios bacteriológicos complementados con la búsqueda de anticuerpos específicos en suero (López Merino, 1999a).

2.5.1 Métodos Directos

El aislamiento de la bacteria es la única evidencia que confirma la existencia de una infección por *Brucella*. Aunque se puede aislar de médula ósea y otros tejidos, la sangre es el material que más se emplea para realizar el cultivo bacteriológico. El mayor número de aislamientos se logran cuando se obtiene la muestra en la fase aguda de la enfermedad, antes de recibir algún tipo de antibiótico y en el período previo a la presentación del pico febril. Es recomendable realizar más de un hemocultivo en días subsecuentes con el fin de aumentar las probabilidades de éxito (Forbes y cols., 2004; López Merino, 1999a).

Para el cultivo primario, se aconseja la inoculación directa de las muestras en medios sólidos para facilitar el reconocimiento y aislamiento de las colonias en desarrollo y limitar el establecimiento de microorganismos mutantes no lisos. Medios tales como agar- suero-dextrosa, agar-suero-papa-infusión, agar-tripticosa, agar-brucella con suero y agar 5% de sangre de oveja (Figura 2) y a partir de sangre y líquidos corporales comúnmente se emplea la botella de Castañeda que contiene un medio sólido y un medio líquido (medio bifásico) (Joklik y cols., 1994).

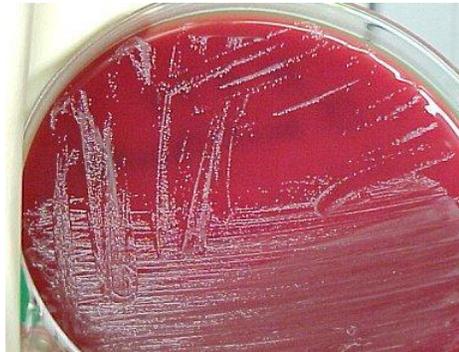


Figura 2. Crecimiento de *Brucella* en Agar 5% de sangre ovina

<http://www.state.sd.us/doh/LabBT/brucellaColony.htm>

La sangre para el cultivo puede recolectarse de la manera habitual en la mayoría de los frascos para hemocultivos comerciales y con el sistema de lisis-centrifugación (Isolator; Wampole Laboratorios, Cranbury, NJ). No hay requerimientos especiales para la recolección, transporte o el procesamiento de las muestras (Forbes y cols., 2004).

Al realizar cultivos de sangre o médula ósea, es necesario revisar diariamente los frascos (medio bifásico de Castañeda); pues al observarse crecimiento en la superficie del agar a las 24 horas de incubación, es probable que este la muestra contaminada por otros gérmenes. Las bacterias comienzan a desarrollarse entre cuatro y cinco días de cultivo (López Merino y cols., 1996).

Una vez que se obtiene el crecimiento, se puede realizar una identificación presuntiva de las colonias que se aislaron para identificar el género con base a las características de morfología de las colonias, coloración de Gram y pruebas de

aglutinación con suero anti-*Brucella*. Procediendo luego a tipificar las cepas por los métodos sugeridos: producción de hidrógeno sulfurado (H₂S) y ureasa, susceptibilidad a la tionina, fucsina básica y comportamiento frente a sueros anti A, M y R (López Merino., 1999a).

2.5.2 Métodos Indirectos

La multiplicidad de pruebas disponibles constituye una clara evidencia de que todas ellas tienen importantes limitaciones que las alejan de la prueba ideal. En líneas generales, la prueba ideal para el diagnóstico de la Brucelosis en una zona de alta incidencia, debería poseer al menos las siguientes características: ser fácil y rápida de realizar, poseer una buena sensibilidad y reproducibilidad, ser capaz de detectar anticuerpos de las clases IgM e IgG, capaz de automatizarse y de un costo reducido (Ango y cols., 1998). Los avances en las pruebas serológicas para la vigilancia y el diagnóstico de la Brucelosis han sido logrados por los recientes conocimientos en la inmunología molecular de los antígenos de *Brucella* (García, 1998).

En Brucelosis humana, el diagnóstico serológico es complejo dado el indiscriminado uso de antibióticos, lo que hace que sea difícil detectar la presencia de la bacteria mientras que los niveles de anticuerpos específicos son muy variables debido a la automedicación, permitiendo esto el acantonamiento de la bacteria en ciertos órganos que pueden conducir a recaídas y cronicidad de la enfermedad, lo que dificulta aún más el diagnóstico. Si bien el método de oro para el diagnóstico de la enfermedad como el de cualquier enfermedad infecciosa, es el aislamiento del agente etiológico, con fines prácticos el más ampliamente usado en Brucelosis es el diagnóstico serológico (Rossetti y cols., 1999).

Dentro de estos métodos indirectos o serológicos están las pruebas de aglutinación (Tabla 1). Durante la fase aguda de la enfermedad cuando predominan los anticuerpos IgM aglutinantes, es fácil detectar la reacción de

aglutinación. A medida que se forman anticuerpos IgG durante el curso de la infección, algunos de ellos se unen al antígeno e impiden así su aglutinación por la gran molécula de IgM (Joklik y cols., 1994).

Entre los métodos serológicos se pueden mencionar:

- **Prueba de Coombs;** útil para determinar Brucelosis crónica; detectando la presencia de anticuerpos no aglutinantes, principalmente del tipo IgG e IgA. El título obtenido es más elevado que el de seroaglutinación por lo general y puede mantenerse positivo de manera prolongada con títulos elevados, incluso en pacientes con tratamiento adecuado y buena evolución clínica. Su desventaja es su capacidad de causar falsos positivos (reacciones cruzadas) con *Vibrio cholerae*, *Franciscella tularensis* y *Yersinia enterocolitica* 09 (Reyes y Villarroel, 2006).

- **Prueba de Rosa de Bengala o Card Test;** recomendada como prueba de escrutinio por ser rápida, sensible y específica. Pone de manifiesto las aglutininas totales de cualquier isotipo, en pacientes con Brucelosis aguda y crónica. Puede permanecer positiva durante algún tiempo, aunque fluctúa entre algunos meses o años, después de concluido el tratamiento y curado el paciente (López Merino., 1999a).

- **Prueba de Aglutinación Estándar;** considerada por algunos investigadores la prueba más confiable por su simpleza y porque presenta un alto grado de correlación con Rosa de Bengala o Card Test, permitiendo determinar la cantidad de aglutininas totales (IgM, IgG) del suero (*ob. cit*).

- **Prueba de Aglutinación con 2 Mercaptoetanol (2-ME);** es una variante de la anterior prueba que emplea un agente reductor para inactivar los anticuerpos IgM presentes en el suero u otros fluidos, el tratamiento permite poner de manifiesto solo aglutininas de los isotipos IgG e IgA. Títulos mayores de 1/25 se consideran

indicativos de la Brucelosis (*ob. cit*). Esta prueba se correlaciona bien con la evolución clínica de la enfermedad (Vásquez y cols., 1999).

- **Prueba de Inmunoensayo Enzimático (ELISA);** Es una prueba de diagnóstico potencialmente más sensible y específica. Se utiliza principalmente para detectar los isotipos de anticuerpos característicos de una Brucelosis aguda y crónica.

Tabla 1. Métodos Indirectos para el Diagnóstico de Brucelosis

MÈTODO	TIPO DE PRUEBA	ANTICUERPOS DETECTADOS	UTILIDAD
Aglutinación	Prueba de Coombs	IgG e IgA	Brucelosis crónica
	Rosa de Bengala	Anticuerpos totales de cualquier isotipo	Brucelosis aguda y crónica
	Aglutinación Estándar	IgM e IgG	Brucelosis aguda y crónica
	2-Mercaptoetanol	IgG e IgA	Evolución clínica de la enfermedad
Inmunoenzimáticas	ELISA indirecto	IgM e IgG	Brucelosis aguda y crónica

Fuente: Del Autor (personal)

Se ha encontrado buena correlación entre ELISA-IgM y pruebas de aglutinación estándar y en menor grado entre ELISA-IgG y 2-ME, debido a que este detecta tanto IgG como IgA (Vásquez y cols., 1999; Reyes y Villarroel, 2006).

El método de ELISA puede detectar un aumento de la IgG e IgA en los pacientes que experimentan una recaída pero no de IgM lo cual ayudaría al diagnóstico de esta situación clínica. En los casos de neurobrucelosis, la prueba de ELISA sería de mayor utilidad que la seroaglutinación (Reyes y Villarroel, 2006).

En animales, el diagnóstico presuntivo se basa en los signos clínicos (abortos en la última fase de la gestación, retenciones placentarias y nacimiento de crías débiles, poco viables). La confirmación se obtiene por aislamiento del agente etiológico y/o pruebas serológicas (D'Pool y Díaz, 2005). En Venezuela, según el artículo 23 de la resolución del Ministerio de Agricultura y Tierra de las Normas para el Programa de Prevención, Control y erradicación de la Brucelosis (Septiembre de 2003), establece el Card Test (Rosa de Bengala) como prueba oficial de campo, quedando para confirmación definitiva las pruebas de ELISA competitiva, Prueba lenta en Tubo, 2-ME y/o Fijación de Complemento.

2.5.3 Métodos Moleculares

Identificación directa: uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (de las siglas en inglés Polimerase Chain Reaction)

Esta técnica está siendo usada cada vez más para el diagnóstico en distintas enfermedades tanto en humanos como animales sensibles (Rossetti y cols, 1999). Estudios realizados previamente han demostrado la posibilidad de detectar *Brucella spp* mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (Ango y cols, 1998).

Esta técnica se basa en la amplificación, mediante una enzima termorresistente (**Taq** DNA pol.), de una zona específica del ADN patógeno en presencia de “primers o cebadores” y una mezcla de nucleótidos e identificación del producto amplificado en geles de agarosa. La biología molecular ha aportado a través de la RCP resultados confiables, pudiendo resolver el problema diagnóstico de la infección por *Brucella* especialmente en casos crónicos donde los cultivos obtenidos tienen rendimiento bajo (Tuncer y cols., 1999).

Las ventajas de la RCP en la detección de *Brucella* está sustentada en la escasa sensibilidad (15-85%) de los cultivos (hemocultivo, mielocultivo) y el tiempo prolongado de recuperación de microorganismos (7-15 días en promedio) en el caso de obtener crecimiento (Ango y cols., 1998).

Entre los métodos modernos para la detección microbial de la Brucelosis se encuentran:

- **Técnica de Electroforesis en Campos Pulsados (pfge);** esta técnica se basa en la separación electroforética en campos pulsados de fragmentos grandes de ADN generados por la acción de una enzima de restricción de bajo número de cortes en el genoma a analizar. Esta técnica refleja una gran especificidad y reproducibilidad en los resultados, siendo de gran valor para realizar estudios epidemiológicos (Rossetti y cols., 1999).

- **Fluorescencia Polarizada;** aplicada tanto a suero, leche y sangre; se basa en la detección de anticuerpos generados por infección cuando estos se adhieren a un antígeno de bajo peso molecular que es la cadena "O" del LPS de la *Brucella abortus*, el cual está conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Rojas y cols., 1999).

Estos métodos de detección microbial son ideales para la determinación del microorganismo para el área de investigación, ya que no son de fácil acceso, ni de fácil elaboración a nivel del laboratorio a diferencia de la RCP considerada como posible método de referencia en un futuro inmediato.

2.6 TRATAMIENTO, PREVENCIÓN Y CONTROL

El tratamiento de la Brucelosis se ha convertido en un complejo desafío para el médico tratante, debido a las particulares características del germen, su capacidad para ingresar y sobrevivir tanto dentro de células del sistema retículo endotelial como en diversos tejidos del organismo. La diferencia de la terapia no

sólo se aprecia por la mejoría inicial y la remisión del cuadro clínico, sino también por el número de recaídas que pudieran sufrir (Sánchez y cols., 1999; Forbes y cols., 2004).

La Tetraciclina es activa en general contra la mayoría de las cepas de *Brucella*; sin embargo, se trata de un fármaco bacteriostático y resultan comunes las recidivas después de la respuesta inicial (Murray y cols., 1997).

Otra terapia alternativa es Ciprofloxacina asociada a Doxiciclina o Rifampicina. La destrucción intracelular de los microorganismos es esencial para la erradicación total de las bacterias y depende de los mecanismos normales de fagocitosis (Reyes y Villarroel, 2006; Alp y cols., 2006; Pappas y cols., 2005).

Se dispone de una vacuna efectiva para la inmunización de animales. Las vacunas dirigidas contra *B. abortus* o *B. melitensis* se utilizan en el huésped animal que corresponde (es decir, vacas, y cabras y ovejas, respectivamente) y son muy exitosas para erradicar la enfermedad en animales (Forbes y cols., 2004).

Entre las vacunas de escasa virulencia con microorganismos vivos, se dispone de la Cepa 19 de *B. abortus*; ampliamente usada en todo el mundo como una herramienta segura contra la Brucelosis en el ganado bovino. La Cepa 19 es eficaz para prevenir la infección y los abortos. Sin embargo, induce falsos positivos en pequeños porcentajes, interfiriendo con la identificación del ganado infectado con cepas de campo. Se recomienda el uso de la vacuna vía subcutánea utilizando 30×10^9 bacterias vivas en dosis de 2 ml en hembras de 4 a 8 meses de edad. Los machos no se vacunan ya que sus títulos persisten por mucho más tiempo y puede ocurrir infección en los testículos. La vacunación en animales infectados no produce ningún efecto sobre el curso de la enfermedad. Se recomienda usar la vacuna liofilizada el mismo día que se procede a reconstituirla (Candelo de Arriojas, 2004).

A partir del desarrollo de la cepa RB51 se eliminaron los problemas de diagnóstico, pues es una cepa altamente atenuada, estable y carente del antígeno "O". Al no poseer este antígeno, permite que la vacunación de los bovinos no induzca anticuerpos correspondientes, por consiguiente los animales vacunados con esta cepa se mantienen serológicamente negativos, permitiendo una fácil diferenciación entre los animales infectados y los vacunados (*ob.cit*).

En Venezuela, se aprobaron según el Ministerio de Agricultura y Tierra, resolución N° 127 y publicado en Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela N°. 37.728 del año 2003, las Normas para el Programa de Prevención,

Control y Erradicación de la Brucelosis en las especies bovinas, porcinas, bubalinas, pequeños rumiantes y a todas aquellas susceptibles a la enfermedad. Se establece que, además del diagnóstico sistemático de la enfermedad y el sacrificio de los animales positivos, deben efectuarse otras actividades del programa como la vacunación antibrucélica obligatoria para las especies susceptibles e inmunizables.

Sin embargo, la vacunación por si sola no puede impedir la entrada de la Brucelosis en una explotación, por lo que deben tomarse otras medidas profilácticas (D'Pool y Díaz, 2005).

La prevención de la Brucelosis humana depende primariamente del control de las fuentes animales de infección. La población de riesgo consiste casi exclusivamente en aquellas personas en contacto con animales o su material contaminado (Joklik y cols., 1994). Es una enfermedad que tiene importancia por su repercusión en la salud de la población humana especialmente en el grupo económicamente activo y por el impacto en la economía en el país, siendo importante recalcar que todavía no se ha llevado a cabo un control adecuado de muchos animales infectados con esta enfermedad (Guillén y cols., 1999). Se encuentra en etapa experimental el desarrollo de una vacuna eficaz contra *B. suis* y diversas vacunas con fracciones de brucelas muertas para seres humanos (Forbes y cols., 2004).

2.7 ANTECEDENTES

En Venezuela, Payares y Ortíz (1940), comprobaron bacteriológica y serológicamente el primer caso humano, donde identificaron *Brucella melitensis* en un paciente proveniente de Calabozo, estado Guárico. Divo y cols (1968), refieren positivities de 5,71%, en personas que laboran en mataderos con una incidencia de 2,73%. Lord (1987), observó que los estados de Venezuela con

mayor incidencia de Brucelosis caprinas en producción fueron de 61,90% en el estado Falcón, 27,94% en el estado Lara y 77,33% en el estado Zulia. El mismo año, Vásquez y Méndez, señalan un índice de positividad de 2,4%, con prevalencias de 11,4%, en trabajadores de granjas porcinas del estado Aragua. En 1993, Vasquéz y Sánchez en el mismo estado reportan porcentajes entre 2,3% y 24,4% en trabajadores de mataderos.

Estudios realizados en diferentes municipios del estado Falcón, Venezuela, se obtuvieron datos de prevalencia entre 9,1% y 14,8% utilizándose únicamente la prueba de Aglutinación en Placa (Colina y Guarecuco, 1991; Plaza, 1991 y Velásquez, 1992). Peña y cols (1995), determinaron una positividad de 10,86% en zonas urbanas y 7,65% en zonas rurales en el estado Mérida. Sosa y cols., (1998), determinaron la prevalencia de *Brucella spp* y la relacionaron con la presencia de sintomatología sugestiva de la enfermedad y la antigüedad laboral; siendo del 24,7% y 3% respectivamente. Observaron una seroprevalencia de síntomas sugestivos de Brucelosis en un rango que osciló entre 22 y 34%.

En una provincia de Argentina, se reportó la existencia de un brote de Brucelosis humana entre trabajadores de granjas; revelando una cerrada relación con una epidemia de abortos caprinos sucedida en la misma granja. La Brucelosis activa fue diagnosticada en 91,3% de los sujetos que estaban en continuo contacto con estos animales (Wallach y cols., 1997).

Serra y Godoy (2000), realizaron una investigación de forma prospectiva sobre la incidencia, la etiología y el perfil epidemiológico de la Brucelosis humana en las regiones del Pallars Jussà y Sobirà (Lleida, España), durante el período 1995 – 1998. Para ello fueron estudiados 55 pacientes diagnosticados con Brucelosis registrándose información sobre el sexo, edad, municipio de residencia, riesgo ocupacional, contacto con animales y consumo de productos lácteos no pasteurizados. Adicionalmente obtuvieron muestras de sangre para hemocultivo. El número de casos fue cuatro veces superior en hombres (81,8%) que en

mujeres (18,2%). Un 71% de estos pacientes trabajaban en ocupaciones de alto riesgo, en donde el mecanismo de contagio era claramente prevalente. La incidencia máxima se produjo entre los meses de Marzo y Abril y la mínima durante los meses de verano. Veintisiete (27) cepas de *Brucella spp* fueron aisladas y todas pertenecientes a la especie de *B. melitensis*. Los resultados del estudio son indicativos de una descripción característica de enfermedad ocupacional. La especie animal más frecuentemente considerada fuente de infección fue la ovina (65%), seguida de la bovina (47%) y la caprina (25%). El agente etiológico fue *Brucella melitensis*, siendo el biovar 1 el más prevalente.

Estudios publicados por Abu Shaqra (2000), registraron un total de 7.842 casos de Brucelosis humana desde 1988 a 1997 en la región de Jordan, encontrándose una relación entre la temporada de cría de ovejas y la ocurrencia de infección en los humanos. La menor incidencia fue observada en 1988 con 16,7%, mientras que en 1991 29,9%. Estos datos no reflejan la frecuencia actual de la infección, subestimando el grado del mismo.

Velásquez (2002) analizando la situación de la Brucelosis en México, cataloga a la enfermedad como una de las zoonosis bacterianas más importantes de ese país, debido a que además de su impacto en la salud pública, es una enfermedad invalidante para el humano y provoca importantes pérdidas económicas a la industria caprina nacional. Durante el período 1997- 2000, se registraron 12.597 casos, de los cuales entre los datos significativos, el sexo masculino reflejó un 53% y el femenino 47%. La edad prevalente de Brucelosis fue entre 25 a 44 años (33,7%); y por fuente de infección se encontró que 5.468 casos se debieron al consumo de queso fresco y leche no pasteurizada.

En Perú, Garro y cols., (2005) determinaron la prevalencia de Brucelosis caprina. En la provincia de Barranca, costa del norte del departamento de Lima, el estudio se efectuó con cabras criollas, donde la mayoría de los sistemas de producción son de tipo extensivo y sedentario, obteniéndose un tamaño muestral de 392 animales no vacunados estratificados entre adultos y jóvenes utilizándose

como prueba diagnóstica la prueba Rosa de Bengala. Los resultados del estudio no detectaron ningún animal positivo a la prueba de aglutinación de Rosa de Bengala en los cuatro distritos de la provincia de Barranca. La ausencia de Brucelosis caprina representa una magnífica ventaja frente a otras áreas ganaderas donde está presente y constituye una amenaza permanente para la salud animal y pública.

Investigadores como Rojas y cols., (2006), determinaron la seroprevalencia de *Brucella spp* en caprinos en 10 distritos de la provincia de Huarochiri en Lima, Perú para determinar el riesgo potencial de Brucelosis caprina sobre el hombre. Se utilizó la prueba de aglutinación Rosa de bengala para la detección de anticuerpos contra *Brucella spp* y un total de 384 sueros de animales. Ninguna muestra resultó positiva a esta bacteria; esto debido a que los animales se encuentran en zonas de altura y alejados de otras regiones caprinas. Por otro lado, desde hace cuatro años se llevan a cabo programas de monitoreo de la enfermedad en dicha provincia, vacunándose a todos los animales mayores a tres meses de edad en los distritos colindantes. De igual forma, se concientiza a los productores de la importancia del problema y se le compromete en el programa de control y erradicación de la enfermedad en estos animales.

Agasthya y cols., (2007) establecieron que profesiones (dada su actividad permanente o temporal) tales como trabajador de mataderos o fincas, ganaderos, veterinarios, pastores entre otros, representan personal de alto riesgo a contraer Brucelosis. Investigaciones realizadas en el distrito de Bidar y Bangalore del estado de Karnataka, India y mediante el análisis de 618 muestras utilizando como prueba el ensayo inmunoenzimático en su modalidad indirecta (ELISA indirecto) y comparando con la prueba Rosa de Bengala y Aglutinación en Tubo; obtuvieron una prevalencia de 90,7 % en veterinarios discriminando en 41,23% en inspectores, 30,92% asistentes, 12,37% oficiales y 6,18% en supervisores. En relación a trabajadores de mataderos, pastores y carniceros la seroprevalencia fue de 6,18%, 2,06% y 1,03% respectivamente. Esto demostró la necesidad inmediata de establecer medidas de control contra la Brucelosis.

CAPÍTULO III

MARCO OPERACIONAL

3.1 TIPO DE INVESTIGACIÓN

El estudio es de tipo descriptivo, debido a que define la presencia de anticuerpos anti-*Brucella* en individuos en contacto con ganado caprino; y de corte transversal, debido a que las muestras fueron tomadas y procesadas en un lapso determinado.

3.2 POBLACIÓN Y MUESTRA

Se estudió una población humana que de acuerdo a la ocupación estuvieran sometidas a posible infección por laborar en las explotaciones de caprinos (cría y manejo) y mataderos (contacto con vísceras y tejidos). Las explotaciones se caracterizan por ser de tipo extensivas o tradicionales, manejadas por grupos familiares. El número de animales por explotación en su mayoría oscilaba entre 150-200 animales, aunque se pudieron observar explotaciones con menor número, con base a esto se seleccionó aproximadamente el 10% de cada explotación visitada. Las explotaciones escogidas se ubicaron en diferentes municipios del estado Falcón de acuerdo a su accesibilidad para la toma de la muestra.

En el caso de los humanos la muestra fue conformada por personas que laboran en la cría y manejo de animales; constituida por el núcleo familiar representada de 5-8 personas encargadas del manejo de los mismos. Calculando a partir de ello un 10% aproximado de esta población se obtuvo una muestra representativa en las distintas explotaciones. A nivel de mataderos la muestra fue distribuida de acuerdo a la actividad ocupacional, personas que laboraban exclusivamente en la matanza de caprinos y en el beneficio tanto de caprinos,

bovinos y otros animales domésticos. También se incluyeron profesionales como médicos veterinarios y técnicos agropecuarios que de una u otra forma están involucrados con estos animales (Tabla 2).

Tabla 2. Muestras sèricas humanas y caprinas recolectadas en los diferentes municipios del Estado Falcón.

MUNICIPIO	TOTAL DE INDIVIDUOS	TOTAL DE CAPRINOS
Buchivacoa	5	57
Democracia	19	57
Federación	4	19
Miranda	55*	---
Sucre	18	177
Urumaco	1	30
TOTAL	102	340

* Solo se tomaron muestras de humanos del matadero Municipal de la Ciudad de Coro (municipio Miranda), Estado Falcón.

3.3 TÈCNICAS E INSTRUMENTOS DE RECOLECCIÒN DE DATOS

Se realizó una encuesta epidemiológica (Anexo 1), donde se contempló la identificación del individuo, lugar de habitación y tiempo de trabajo, presencia de signos clínicos y síntomas, entre otros puntos. Debido a que la Brucelosis no presenta un signo patognomónico específico, se tomó en cuenta la aparición de anticuerpos para así establecer la presencia o ausencia de infección y su asociación.

3.4 TÈCNICAS DE ANÀLISIS DE LA MUESTRA BIOLÒGICA

Muestra biológica: Se tomó la muestra de sangre mediante la técnica de punción venosa, en la cara anterior del brazo izquierdo o derecho. La muestra se almacenó en tubos de ensayo estériles al vacío de 13x100mm, identificándolos debidamente con datos del paciente; luego se colocaron en una cava de hielo y posteriormente se procedió a separar el suero por medio de centrifugación a 3000

rpm por 10 minutos, distribuido inmediatamente en viales de 2ml y conservados a -20°C para su análisis.

En los caprinos la muestra se obtuvo con tubos de ensayo estériles al vacío para lo cual, primero se inmovilizó el animal y se le estiró el cuello hacia un lado, se ocluye la vena yugular con una mano y con la otra se realizó la punción (McCurnin, 1987). Posteriormente se centrifugaron las muestras a 3000 rpm por 10 minutos, se distribuyeron en viales de 2 ml y se congelaron a -20°C hasta su procesamiento.

3.4.1 PRUEBAS SEROLÓGICAS

3.4.1.1 Preparación Antigénica:

Se empleó como antígeno una suspensión de células de *Brucella abortus* cepa 1119-3 en distintas concentraciones y valores de pH, dependiendo de la prueba de aglutinación. En ELISA indirecto (ELISAI), se empleó el Lipopolisacárido purificado de la pared celular de *Brucella abortus* como antígeno.

3.4.1.2 Controles:

Controles positivos: se utilizaron sueros tanto en humanos como animales que tienen actividad anti-*Brucella* determinada mediante Aglutinación en Placa y Tubo 2- Mercaptoetanol; cuyos títulos de anticuerpos son de 1/100 y 1/200 y Card-Test positivo.

Controles negativos: se emplearon sueros que no tienen reactividad en las mencionadas pruebas serológicas.

3.4.1.3 Prueba de Aglutinación en Placa (PAP): Para la realización de dicha prueba se siguió la metodología descrita por Alton y cols., (1976). La fuente de antígeno usada fue una suspensión al 11% de células intactas de *Brucella abortus* a pH 6,4 adicionada con verde brillante y cristal violeta. Esta técnica consiste en determinar la presencia o no de grumos que se producen por la aglutinación de las células frente a las aglutininas anti-*Brucella* presentes en el suero, para unas diluciones 1/25, 1/50 1/100 y 1/200.

Metodología a seguir:

- a) Se toman 0,2 ml de suero con una pipeta de Bang. Esta se inclina en un ángulo de 45° y se pone en contacto con la placa, depositándose cantidades de 80µl, 40µl, 20µl y 10µl en hileras de cuatro.
- b) Agitar suavemente el antígeno y colocar 0,03ml en cada hilera empezando por la gota de 10µl, se mezclan cuidadosamente.
- c) La placa se mueve cuatro veces en forma rotativa para homogeneizar.
- d) Colocar la placa en un aglutinoscopio o cámara oscura. Cerrar la tapa para evitar evaporación, y dejar por cuatro minutos.
- e) Pasado este tiempo la placa se mueve en forma rotativa cuatro veces llevándose la placa nuevamente al aglutinoscopio o cámara oscura dejándose cuatro minutos, para su posterior lectura.

3.4.1.4 Prueba de Aglutinación en Tubo (PAT): El antígeno se prepara al 2% en solución salina al 0,85%, suplementado con fenol al 0,5%. En el caso de que la determinación sea en ganado caprino, el antígeno se prepara al 2% en solución salina al 5% suplementado con fenol al 0,5%. Para ambos casos se utilizaron diferentes volúmenes de suero (0,08 – 0,001 ml) con la suspensión de células de modo que las diluciones séricas finales fueran: 1/25, 1/50, 1/100 y 1/200 incubándose luego por 40 a 48 horas a 37°C. La lectura se realizó por la observación de la aglutinación del antígeno bajo la forma de flóculos en suspensión (Centro Panamericano de Zoonosis., 1968).

3.4.1.5 Prueba de 2-Mercaptoetanol (2-ME): El tratamiento del suero con agentes reactivos como el 2-Mercaptoetanol, disocian la molécula pentamérica del anticuerpo de clase IgM y reduce su actividad aglutinante sin afectar las de los isotipos IgG. En dicha técnica el antígeno y las diluciones de suero usadas son las descritas para la prueba de aglutinación en tubo, cambiando la solución fenolada por una de 2-ME al 0,78%. Luego se incuba por 40 a 48 horas a 37°C. La lectura se realizó igual que en la prueba de aglutinación en tubo (Anderson y cols., 1964).

La metodología a seguir es la siguiente:

- a) Se dispone de un número requerido de tubos de ensayo en cuatro filas en gradillas adecuadas.
- b) Se coloca 0,08ml de suero en el primer tubo, 0,04ml en el segundo, 0,02 en un tercer tubo y 0,01ml en el cuarto tubo. Se efectúa lo mismo en las siguientes hileras.
- c) Posteriormente con una pipeta automática o mecánica se coloca 1ml de solución salina fenolada al 5% (en el caso de caprinos y al 0,5% en humanos) o solución de 2-ME 0,78% según corresponda.
- d) Se mezclan y por último se añade 1ml de antígeno según la técnica correspondiente, debidamente diluido obteniéndose diluciones 1/25, 1/50, 1/100, 1/200.
- e) Incubar por 48 horas a 37°C.

3.4.1.6 Prueba de Card-Test (CT): Ensayo diseñado por Nicoletti en 1969 y consiste en enfrentar 0,03 ml de una suspensión celular al 8% pH 3,6 que contiene Rosa de Bengala con 0,03 ml de suero sin diluir. Esta prueba es de tipo cualitativa, calificándose una muestra como positiva cuando se observa aglutinación macroscópica, en forma de grumos moderados a grandes (flóculos). Una muestra negativa presenta partículas dispersas en grumos.

Interpretación de las pruebas:

A fin de interpretar las diferentes pruebas serológicas usadas, se estableció el siguiente criterio para caprinos:

- Se considera sospechoso, cuando reacciona con títulos de 25 UI/ml en las pruebas de aglutinación rápida en placa y lenta en tubo, siendo positivo a partir de una aglutinación que corresponda a 50 UI/ml en dichas pruebas.
- Sueros con niveles de Anticuerpos (25 UI/ml) en la PAP y PAT se catalogan como sospechosos.
- En el 2-ME se considera como positivo cuando exista reactividad a cualquier dilución (Cómite de Expertos en Brucelosis, 1971).

Para humanos a partir de 100 UI/ml en la PAP y PAT se considera positivo.

3.4.1.7 Prueba de Inmunoensayo Enzimático (ELISA): (Modalidad Indirecta)

Para realizar la estandarización de las inmunoglobulinas de clase IgG e IgM, se emplearon distintas diluciones del conjugado, manteniendo constante la dilución del suero (1:100), contra una determinada concentración del s-LPS de *Brucella abortus* y frente a sueros humanos positivos y negativos. En relación a la estandarización del anti IgG caprino, se utilizaron distintas diluciones del conjugado, en presencia de una concentración de s-LPS *Brucella abortus*, dilución del suero 1:100 y frente a sueros caprinos positivos y negativos.

Partiendo de esto, se obtuvieron las siguientes condiciones de trabajo:

- ❑ Anti IgG humano diluido 1:500.
- ❑ Anti IgM humano diluido 1:1000.
- ❑ Anti IgG caprino diluido 1:4000.
- ❑ Dilución del suero (caprino y humano) 1:100.
- ❑ s-LPS *Brucella abortus* : 1 µg/ml.

Este ensayo se llevó a cabo de la siguiente manera: se sensibilizaron placas de poliestireno (**Dynatech Laboratories, Inc., Alexandría, Va**) de 96 pozos con 100 µl de la concentración óptima de antígeno tanto para humanos como para caprinos, determinada por microtitulación. La preparación antigénica diluida en buffer Carbonato/Bicarbonato 0,06 M, pH 9,6 se deja absorbiendo toda la noche en nevera; para luego lavar cinco veces con una solución buffer fosfatada 0,01M pH 7,2 con cloruro de sodio y Tween 20 al 0,5% (PBS-T), se colocaran entonces 100 µl de los sueros diluidos en PBS-T y se deja reaccionar por espacio de una hora a 37°C. Después de lavar cinco veces de nuevo, se colocan 100 µl de la solución de anti-IgG caprina, anti-IgG y anti-IgM humana, conjugada con Peroxidasa de rábano picante (Sigma). Tras incubar por una hora a 37°C se elimina el exceso de conjugado mediante un lavado exhaustivo (cinco veces con PBS-T) y se adiciona 100 µl de solución ABTS (2,2-azinodi 3 ethilbenzothiazoline-6 sulfonic acid), 40 mM en agua destilada, buffer citrato 0,05 M pH 4,5 y de

peróxido de hidrógeno (H₂O₂) al 3%. Cuando se alcanza la intensidad del color, esta reacción colorimétrica se mide en lecturas de absorbancia y en una determinada longitud de onda (410 nm) con un espectrofotómetro Modelo MR-500 Dynatech.

Se utilizó como fuente antigénica s-LPS de *Brucella abortus*. Para ello se prepara una solución cuya concentración es de 1mg/ml en Buffer carbonato bicarbonato 0,06 M y pH 9,6. Luego es sonicado 6 veces por espacio de 1 minuto, a intervalos de 1 minuto. Se almacenó en alícuotas a -20°C hasta utilizarlo. La concentración de antígeno óptima para sensibilizar las placas se realizó con una concentración de Lipopolisacáridos (LPS) de 1µg/ml.

3.4.2 ANÁLISIS DE DATOS

Se estimó la frecuencia construyendo el intervalo al 95% de confianza para el porcentaje de Brucelosis (Canavos, 1992). Se analizó la dependencia entre las variables utilizando la prueba exacta de Fischer y su correspondiente riesgo relativo indirecto (odds-ratio) para las tablas de dimensión de 2 x 2. Se utilizó la prueba de independencia de chi-cuadrado (X²) para caracterizar la naturaleza, en caso de ser significativa (Agresti, 2002).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Fueron evaluadas 442 muestras séricas, 340 de caprinos y 102 de sueros humanos, tomadas de distintas explotaciones de este tipo de ganado, al igual que de mataderos en los diferentes municipios del estado Falcón, siendo el municipio Sucre donde se recolectó el mayor número de muestras por ser geográficamente más accesible y donde se encontró el mayor número de animales, tal y como se observa en la Tabla 3.

Tabla 3. Número de Individuos y Ganado Caprino en Explotaciones del estado Falcón.

Municipios	Nº de explotaciones	Humanos	Caprinos
Buchivacoa	3	5	57
Urumaco	1	1	30
Federación	1	4	19
Democracia	2	8	57
Sucre	7	18	177
Total	14	36	340

Las muestras humanas fueron tomadas de individuos que laboraban en las distintas explotaciones y a nivel de mataderos tomando en consideración el alto riesgo en contraer Brucelosis de acuerdo a su actividad ocupacional (Tabla 4).

Tabla 4. Distribución de Individuos en Alto Riesgo de **Contraer Brucelosis de Acuerdo a su Actividad**

Ocupacional.

Actividad Ocupacional	Nº de Individuos
Cría de ganado caprino	36
<i>Beneficio de caprinos</i>	17
<i>Beneficio de caprinos, bovinos y otros</i>	37
Médico Veterinario y Técnico Agropecuario	12
Total	102

Se estableció el criterio de positividad del ensayo inmunoenzimático (ELISA) indirecto mediante el uso de sueros humanos negativos a Brucelosis por las diversas pruebas de aglutinación y se tomaron en cuenta las pautas establecidas en la metodología. Es por ello que para los anticuerpos de tipo IgG humano, el promedio de Densidades Ópticas (D.O) fue de 0,027 y la desviación estándar 0,011 por lo tanto al sumarle tres veces este valor al promedio da como resultado una absorbancia de 0,061 lo cual se consideró como punto de corte.

En cuanto a los valores de IgM, se obtuvo un promedio de D.O igual a 0,047 y una desviación estándar de 0,025 que sumando tres veces este valor al promedio se obtiene una absorbancia de 0,122 siendo este el punto de corte. En ambos casos se consideraron como positivos todos aquellos valores cuya D.O fuesen mayores que el punto de corte al cual se hizo referencia, menores de estos negativos (Figuras 3 y 4).

Figura 3. Distribución de las Densidades Ópticas para la Obtención del Punto de Corte de IgG humana

usando Sueros Controles Negativos.

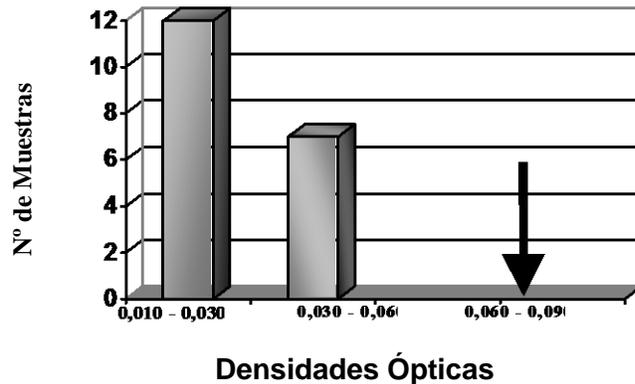
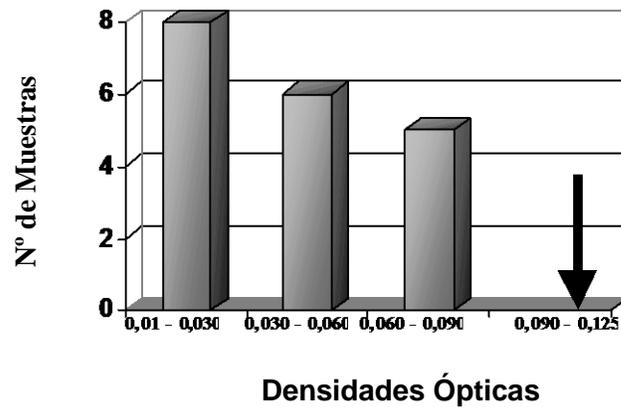


Figura 4. Distribución de las Densidades Ópticas para la Obtención del Punto de Corte de IgM humana usando Sueros Controles Negativos.



Con respecto a los resultados de las Pruebas de aglutinación, en las que fueron evaluados 102 individuos se encontraron ocho personas reaccionantes por la prueba de Aglutinación en Placa (PAP), de las cuales seis son considerados sospechosos por obtener títulos de 25 y 50 UI/ml y dos fueron positivos con títulos de anticuerpos de 100 UI/ml. Por otra parte la Prueba de Aglutinación en Tubo (PAT) encontró siete individuos reaccionantes, de los cuales uno resultó positivo con un título de anticuerpo de 100 UI/ml y a su vez positivo en PAP y por el método de Inmunoensayo Enzimático indirecto (ELISAi) para IgM. Los seis

restantes se consideraron sospechosos con títulos entre 25 y 50 UI/ml; dos de los cuales eran positivos tanto en 2-Mercaptoetanol (2-ME), como por ELISAI para IgG.

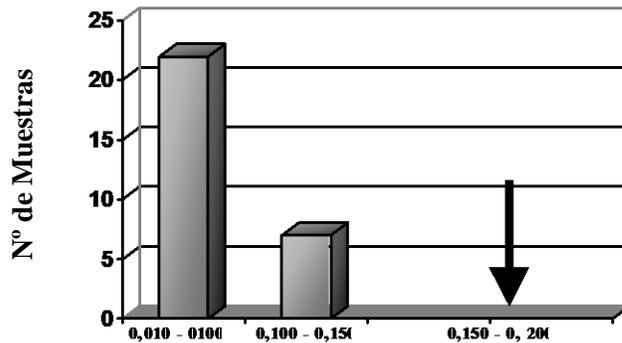
En cuanto a la prueba de CT, hubo un total de cinco individuos positivos; siendo a su vez uno positivo por PAP con un título de 100 UI/ml. En la evaluación de las muestras de acuerdo al ELISAI se siguieron los patrones ya mencionados, detectándose 19 personas positivas, de las cuales tres tenían tanto IgG como IgM, siete con solo IgG y nueve con IgM. De cinco personas positivas por el método ELISAI, uno fue positivo a IgG, reaccionando a la vez con CT; sabiendo que esta prueba permite detectar principalmente IgG y es poco sensible para IgM. Mientras que los cuatro restantes que fueron positivos a IgM coincidieron con la PAP, considerando tres sospechosos y uno positivo, afirmando que la prueba en placa determina anticuerpos de tipo IgM y poco IgG (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados de la Serología para el Diagnóstico de Brucelosis Humana.

Resultados	Pruebas Serológicas						
	PAP	PAT	2-ME	CT	ELISAI IgG	ELISAI IgM	ELISAI gG/IgM
Positivos	2	1	2	5	7	9	3
Sospechosos	6	6	-	-	-	-	-
Negativos	94	95	100	97	95	93	99
Leyenda:	CT: Card Test		2-ME: 2-Mercaptoetanol				
	PAP: Prueba de Aglutinación en Placa.		PAT: Prueba de Aglutinación en Tubo				
	ELISAI: Inmunoensayo enzimático indirecto						

En lo referente al análisis de las muestras de caprinos se aplicó el ELISAI, en el cual se obtuvo un promedio de densidades ópticas (D.O) de 0,084 y la desviación estándar de 0,028, que sumándole tres veces este valor al promedio, dio como resultado una absorbancia de 0,168. Toda densidad D.O igual ó mayor que este valor se consideró positivo. Resultados menores que 0,168 son negativos (Figura 5).

Figura 5. Distribución de las Densidades Ópticas para la Obtención del Punto de Corte de IgG Caprino usando Sueros Controles Negativos.



Densidades ópticas

Adicionalmente los resultados obtenidos en las Pruebas de Aglutinación, de 340 muestras de ganado caprino analizadas se observó que por la PAP se obtuvo un número de 17 animales reaccionantes, de las cuales 15 presentaban títulos de anticuerpos de 25 UI/ml, considerándose como sospechosos, mientras que los otros dos fueron identificados como positivos con un título de 50 UI/ml. En la Prueba de Aglutinación en Tubo, 11 muestras produjeron reactividad, nueve sueros fueron positivos y a su vez, tres de estos coincidieron con positividad a la PAP con títulos de 25 UI/ml, mientras que los dos restantes se encontraron sospechosos por obtener un título de anticuerpos igual a 25 UI/ml. Por otro lado la prueba del 2-ME arrojó un resultado positivo (25 UI/ml), que a su vez había resultado con títulos de 25 UI/ml tanto en Prueba de Aglutinación en Placa como en Tubo.

En cuanto al ensayo Card Test, del total de animales estudiados, 12 fueron considerados positivos, de los cuales nueve de ellos reaccionaron por la PAT con títulos de 50 UI/ml y además uno de ellos también fue positivo en la Prueba en Placa con un título de anticuerpos igual a 100 UI/ml. Por medio del ELISAI se encontró un total de siete animales positivos a la prueba (Tabla 6).

Tabla 6. Resultados de las Muestras de la Serología para el Diagnóstico de Brucelosis Caprina.

<i>Resultados</i>	<i>Pruebas Serológicas</i>				
	<i>PAP</i>	<i>PAT</i>	<i>2-ME</i>	<i>CT</i>	<i>ELISAI (IgG)</i>
<i>Positivos</i>	2	9	1	12	7
Sospechosos	15	2	-	-	-

Positivos	1	2	1	1	2	7	9	3
Leyenda:	CT: Card Test		2-ME: 2-Mercaptoetanol				TOTAL	26
	PAP: Prueba de Aglutinación en Placa		PAT: Prueba de Aglutinación en Tubo					
	ELISA: Inmunoensayo enzimático indirecto							

Mediante datos recolectados en la encuesta epidemiológica se estableció que 13 de las 26 personas positivas por serología presentaban síntomas compatibles con la enfermedad, mientras que 13 expresaron no haber sufrido manifestación alguna. En la Tabla 9, se presenta la distribución de los síntomas que refirieron tener los individuos con anticuerpos a *Brucella*, resaltando que la mayoría de ellos reflejaban más de un síntoma a la vez.

Tabla 9. Sintomatología Sugestiva de Brucelosis en Individuos Serológicamente Positivos del estado Falcón.

Sintomatología	Nº de Individuos
Fiebre en los últimos 6 meses	5
Debilidad	4
Dolor en las articulaciones	6
Dolor de cabeza	7
Escalofrío	3
Sudoración	2
Pérdida de peso	3
Ninguno	13

Adicionalmente, es necesario resaltar que de los 76 pacientes considerados negativos en las pruebas serológicas, 22 presentaron manifestaciones clínicas sugestivas de Brucelosis.

En cuanto a los hábitos alimenticios es importante destacar que cuatro (4) de los 26 individuos infectados, afirmaron consumir queso de cabra, como también leche de cabra sin hervir, mientras que otro individuo manifestó haber estado en

contacto con los productos del aborto de ciertos caprinos en los meses de recolección de las muestras séricas.

En la tabla 10, podemos observar que los Médicos Veterinarios y Técnicos Agropecuarios poseen 2,35 veces más probabilidad o riesgo de presentar anticuerpos para Brucelosis humana en relación al resto de las actividades ocupacionales.

En referencia a la distribución de positividad en Ganado caprino, se encontró un total de 7,9%, que al desglosarse por municipio varió desde un 3,5% hasta 10%. Adicionalmente, es importante destacar que el porcentaje total obtenido en personas que laboran en explotaciones fue de 22,2%, en el cual si se estratifica por área estos valores varían desde 11,1% hasta 100% (Tabla 11).

Tabla 10. OR Estimado para Actividad Ocupacional y Presencia de Anticuerpos en Brucelosis Humana del estado Falcón.

Variable	OR	IC	Chi ²	P
Médico Veterinario y Técnico Agropecuario	2,35	0,57-9,47	1,03	0,30
Cría de Ganado Caprino	0,76	0,26-2,17	0,10	0,74
Beneficio de Caprinos	1,27	0,34-4,53	0,01	0,91
Beneficio de Caprinos, Bovinos y otros	0,72	0,25-2,05	0,19	0,65

Tabla 11. Distribución del Porcentaje de Positividad en Humanos y Caprinos en las Explotaciones del estado Falcón.

Municipio	N	ANIMALES		HUMANOS		
		F. absoluta (n)	F. relativa (%)	N	F. absoluta (n)	F. relativa (%)
Democracia	57	5	8,8	9	1	11,1
Federación	19	1	5,3	4	2	50
Buchivacoa	57	2	3,5	5	1	20
Urumaco	30	3	10	1	1	100
Sucre	177	16	9	17	3	17.6

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- ★ Se detectó la presencia de anticuerpos anti - *Brucella* en individuos de alto riesgo por estar en contacto con ganado caprino en diversos municipios del estado Falcón.
- ★ Se encontró la infección del ganado caprino en todos los municipios estudiados mediante la presencia de anticuerpos anti - *Brucella*.
- ★ Se evidenció la coincidencia entre animales positivos e individuos positivos en la misma área.
- ★ En la muestra total de trabajadores positivos se pudo corroborar un alto porcentaje de síntomas sugestivos de Brucelosis tales como artralgias, cefaleas y fiebre principalmente; mientras que cifras más bajas correspondieron a escalofríos y pérdida de peso; destacando que los individuos positivos presentaron más de un síntoma a la vez.
- ★ Todas las actividades ocupacionales tomadas en cuenta en el estudio demostraron que todos los individuos independientemente de su actividad ocupacional o alto riesgo tienen la misma probabilidad de producir anticuerpos para Brucelosis humana.
- ★ Es necesario implementar el seguimiento y vigilancia de las personas que se encuentren en alto riesgo de contraer Brucelosis, para así conocer el comportamiento de los títulos de anticuerpos y evolución de la infección en todo individuo reaccionante.

- ★ Seguir reforzando los Servicios de Sanidad Animal, a los fines de llevar a cabo la vigilancia y control de la infección tanto en el animal como el individuo, requiriendo para ello apoyo humano, material y tecnológico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abu Shaqra, Q.M. (2000). Epidemiological aspects of Brucellosis in Jordan. Europe J. Epidemiology. Jun. 16 (6): 581-4
- Acha, P. y Szyfres, B. (1986). Zoonosis y Enfermedades Transmisibles Comunes al Hombre y a los Animales. 2^{da} Edición. OPS/OMS, Washington. pp. 14-36.
- Agasthya, A.S.; Isloor, S y Prabhudas, K. (2007). Brucellosis in High Risk Group Individuals. Indian J. Med. Microbiol. 25 (1): 28-31.
- Agresti, A. (2002). Categorical Data Análisis. 2da Edición. Wiley – Interscience. New Jersey.
- Aldridge, M. (1999). *Brucella ovis*. [Artículo en línea]. Disponible en <http://www.ag.state.co.us/animals/livestock/20dise/asebruovis>.
- Aleixo, M.J.; Ferreira, M.L. y Antunez, F. (1999). Brucellosis. Acta Médica Portuguesa. Dec; 12 (12): 323.
- Alp, E.; Kemal K., R.; Candan D., A.; Yildiz, O.; Aygen, B.; Sumerjan, B. y Doganay, M. (2006). Doxycycline plus streptomycin versus ciprofloxacin plus rifampicin in spinal brucellosis [ISRCTN31053647]. BMC Infect. Diseases., Apr. 6: 72.
- Alton, G.; Jones, L.; Angus, R. y Pites, D. (1976). Techniques for the Brucellosis Laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique. París, Francia. p. 190.
- Anderson, R.K.; Jonnes, R.; Brumfield, H. y Golrigh, P. (1964). Brucella Agglutinating Antibodies relation of Mercaptoetanol Stability to complement fixation. Science. 143: 131. 1335.
- Ango, H.; Romero, J.; Guillen, A.; Colichon, A. y Balazar, D. (1998). Estandarización de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de *Brucella spp*. En: Networking Brucellosis Research Proceeding of the ONU/BIOLAC. Brucellosis Workshop. (Editorial Frank J.). Vol II. p.p – 38-41. United Nations University Press. Impreso en Malasia. ISBN 92-808-1010-3.
- Araj, G.F. (1986). Evaluation of ELISA in the diagnosis of Acute and Chronic Brucellosis in Human Beings. J. Hyg. Cambridge, 97: 457.
- Canavos, G. (1992). Probabilidad y Estadística. Aplicaciones y Métodos. Editorial Mc Graw Hill. México, D.F.
- Candelo de Arriojas, N. (2004). Todo lo que se debe saber sobre Brucelosis en Bovinos. Revista Digital del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Venezuela (CENIAP HOY). Ene-Abr. N° 4. [Artículo en línea] (Fecha de acceso: Mayo de 2007). Disponible en: <http://www.ceniap.gov.ve/ceniaphoy/articulos/n4/texto/ncandelo.htm>
- Castro, H. A.; González, S. R. y Prat, M. I. (2005). Brucelosis: una revisión práctica. Acta Bioquím. Clin. Latinoam. 39 (2): 203-216.
- Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC) (1999). Información Técnica sobre Brucelosis. [Artículo en línea]. Disponible en <http://www.google.com>.

Centro Panamericano de Zoonosis (1968). Técnica e Interpretación de las Pruebas de Seroaglutinación de la Brucelosis. OMS. Nota Técnica 2. Rev. 1.

Colina, A. y Guarecuco, J. (1991). Epidemiología de la Brucelosis Caprina en el Municipio Autónomo Democracia del Estado Falcón. Trabajo de Grado para optar al título de Médico Veterinario no publicado. Universidad Experimental Francisco de Miranda. Coro, edo. Falcón.

Comach, P.G. (1992). Brucelosis: Antropozoonosis Ocupacional de las Granjas Porcinas en la Región Central. [Artículo en línea]. Disponible en <http://www.fundacite.arg.gov.ve/proyectos/proyecto.shtml?codigo=421>.

Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Brucelosis. (1971). Quinto Informe. Servicio de Información Técnica. Nº 464, Ginebra – Suiza. p. 100.

Condron, R.; Spath, E.; De Ríos, L.; González, R.; Habich, G.; Bisceglia, C.; Córdoba, S.; Rivero, M.; Jiménez, J.; Khune, G.; Guglielmone, A.; Herrera, C.; Benítez, E.; Salem, E. y Fortuna, N. (1980). Brucelosis Caprina y Humana en el Departamento de Rivadavia, Provincia de Salta, Argentina. Bol. Of. San. Pam. 80 (5):432-439.

Corbel, M. (1997). Brucellosis: an Overview. Em. Inf. Disease. 3 (2): 213-221.

Divo, A.; Blanco, R.; Plata, V.; Mogollón, P. y Benavides, G. (1968). La Brucelosis como Enfermedad Ocupacional en el Estado Carabobo. Rev. Med. Vet. 22: 5-34.

D'Pool, G. y Díaz, D. V. (2005). Brucelosis. Manual de Ganadería Doble Propósito. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia.

Forbes, B. A; Sahm, D.F; y Weissfeld, A.S. (2004). Bailey and Scott Diagnóstico Microbiológico. 11^{ava} Edición. Editorial Médica Panamericana. pp. 507-510. Buenos Aires, Argentina.

García L., C. y García M, G. (1995). Epidemiología Serológica de la Brucelosis Caprina en el Estado Falcón. 1er. Congreso Nacional de Ovinos y Caprinos. Barquisimeto, edo. Lara. Universidad Centro Occidental Lisandro Alvarado.

García, O.; Pelegrino, A.E.; Corcho, O. y Viton, T.D. (1995). Evaluación de ELISA DAVIH-BRU-1 en el Diagnóstico Serológico de la Brucelosis Humana. Rev. Cub. Med. 34 (3).

García, M. (1998). New Approaches to Microbial Detection in Diagnostics. En: Networking Brucellosis Research Proceedings of the UNU/BIOLAC. Brucellosis Workshop. (Editor Frank J.). Vol II, pp. 38-41. United Nations University Press. Impreso en Malasia. ISBN 92-808-1010-3.

García, M. (1999). Brucellosis Bacteriology. En: Simposium Internacional de Brucelosis. pp. 151-152. Maracay, edo. Aragua.

Gotuzzo, E.; Bocanegra, T.; Alarcón, Carrillo, C. y Espinoza, L. (1985). Humoral Immune Abnormalities in Human Brucellosis. Inm. Vol. 13, Nº 5. pp. 417-424.

Garro A., E.; Delgado C., A.; Evaristo R., R. y Manchego S., A. (2005). Prevalencia de Brucelosis Caprina en la Provincia de Barranca, Lima. Rev. Inv. Vet. Perú, 16 (2): 184-186.

Guillén, A.; Navarro, A.M. y Sánchez, L. (1999). Epidemiología de la Brucelosis. En: Simposium Internacional de Brucelosis. Memorias (A. Vásquez, ed.). Taller de Artes Gráficas – FONAIAP. Venezuela. pp. 82-92.

- Joklik, W.; Willet, H.; Amos, A. y Wilfert, C. (1994). Microbiología de Zinsser. 20^{ma} Edición. Editorial Médica Panamericana. pp. 576-592. Buenos Aires, Argentina.
- Kalelioglu, M.; Ceylan, S.; Koksall, I.; Kuzeyli, K. y Aktürk, F. (1990). Brain Abscess Caused by *Brucella abortus* and *Staphylococcus aureus* in a chile. *Infec.* 18. N° 6 München. pp 70.
- López-Mèrino, A.; Lòpez, S.; Ocampo, D.; Monroy, L. y Domínguez, F. (1991). Brucelosis: Avances y Perspectivas. Publicación Técnica del Indre. N° 6. México, D.F. pp. 24-25.
- López – Merino, A.; Sealy C., M.; Andueza, F. y Pérez, C. (1996). Manual de Técnicas y Procedimientos para el estudio y diagnóstico de la Brucelosis. Mérida pp. 1-6.
- López - Merino, A. (1999a). Diagnóstico de la Brucelosis Humana en: Simposium Internacional de Brucelosis. Maracay. Venezuela. pp. 100-103.
- López – Merino, A. (1999b). Epidemiología de la Brucelosis en México en: Simposium Internacional de la Brucelosis. Maracay – Estado Aragua.
- López, R. y Sánchez J. (1986). Aspectos de la relación Huésped – Parásitos en Brucelosis. *Infectología.* Año 6 N° 11. México. pp 499-506.
- López, R., (1999). Inmunidad e Inmunopatogenia en Brucelosis Humana. En: Simposium Internacional de Brucelosis. Maracay – Estado Aragua. pp 93-97.
- Lord, V. de (1987). Brucelosis en Caprinos: Estudios Serológicos y Bacteriológicos en Venezuela. *Veterinary Tropical.* 12: 27-37.
- Madkour, M. (1989). Historical Aspects of Brucellosis. En: Brucellosis (M. Madkour, ed.). University Press, Cambridge, Inglaterra. pp. 71-89.
- Martin, S. The Evaluation of Test. *Can. J. Comp. Med.* 1977; 41: 19-25.
- McCurning, M. (1987). Técnicas Veterinarias. Editorial El Manual Moderno, SA: de C.V. México. p 578.
- Mims, C.; Playfair, J.; Roiit, I.; Wakellin, D. y Williams, R. (1995). Microbiología Médica. Editorial. Mosby Dosma.
- Ministerio de Agricultura y Tierra. Resolución N°. 127. (2003). Normas para el Programa de Prevención, Control y Erradicación de la Brucelosis. Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela. N° 37.728.
- Murray, P.; Kobayaski, G.; Pfaller, M. y Rosenthal, K. (1997). Microbiología Médica. 2da Edición. Editorial Harcourt Brace.
- Nicoletti, P. (1969). Further Evaluations of Serologic test Procedures used to diagnose Brucellosis. *Am. J. Vet. Res.* 30(10): 1811-1816.
- Osejo, A.F.; Chilangua, L.F.; Astudillo, D.; Canaval, Z.E. y Delgado, M.F. (2005). Prevalencia de Brucelosis Humana en Trabajadores de Mataderos en el Departamento del Cauca-Colombia. [Artículo en línea] (Fecha de acceso: Agosto de 2007). Disponible en: www.google.com
- Pantoja, A. (2001). Estudio Serológico de Brucelosis Caprina en la Parroquia Guzmán Guillermo del Municipio Miranda del Estado Falcón. Trabajo de Grado presentado a la Universidad Centra de Venezuela para optar al título de Magíster Scientiarum en Medicina Veterinaria, mención Microbiología. Maracay, edo. Aragua.
- Payares, L. y Ortiz, M. (1940). *Revista Policlínica de Caracas.* 51: 3381-3390.

Pappas, G.; Akritidis, N.; Bosilkovski, M. y Tsianos, E. (2005). Brucellosis: Review Article. N. Engl. J. Med., Jun. 352: 2325-2336.

Peña, A.; Capitano, L. y Pérez, M. (1995). Brucelosis Humana: Estudio Seroepidemiológico distrito sanitario Tovar, Estado Mérida, Septiembre 1994 – Enero 1995 XXII. 1^{eras} Jornadas Venezolanas de Microbiología. Sociedad Venezolana de Microbiología.

Plaza, M. (1991). Prevalencia de Brucelosis Caprina en Rebaños del Municipio Autónomo del Estado Falcón. Trabajo de Grado para optar al título de Médico Veterinario no publicado. Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda. Coro-edo, Falcón.

Rodríguez F, M.A.; Arévalo, V.V.; Becerra. B, H.O.; Arias. I, J.L y Napoleón. S, E. (2004). Prevalencia Serológica y Factores Asociados a la Infección de Brucelosis en una Población de Alto Riesgo, en el Municipio de Tapachula, Chiapas. México. Asociación Mexicana de Bioquímica Clínica, AC. Bioquímica. Vol. 29. Sup. 1.

Reyes J, A. y Villarroel B, J. (2006). Brucelosis en un Escolar. Rev. Chil. Infect., 23 (4): 351 – 358.

Rojas, X.; Alonso, O.; Wojciechowski, E.; Pérez, B.; Nielsen, K.; Gall, D. y Kelly, W. (1999). Diagnóstico de Brucelosis Bovina en Suero Sanguíneo, Leche y Sangre mediante Técnicas de Unión Primaria ELISA de competencia, ELISA indirecto y Fluorescencia Polarizada. En: Simposium Internacional de Brucelosis. Maracay – Estado Aragua. pp 57.

Rojas G., W.; Delgado C., A. y Evaristo R., R. (2006). Seroprevalencia de *Brucella sp* en Caprinos de Huarochiri, Lima. Rev. Inv. Vet. Perú. 17 (1): 73-76.

Rossetti, O.; Arese, A.; Campos, E.; Gagliardo, L. y Craver, S. (1999). Aplicación de la Biología Molecular en la Brucelosis. En: Simposium Internacional de Brucelosis. Maracay – Estado Aragua. pp 66-67.

Sánchez De Porras, E.; Comach, G.; Vásquez De Cedeño, A. y Sosa, G. (1999). Aplicación de la Prueba de ELISA en el Diagnóstico de la Brucelosis en Personas Ocupacionalmente Expuestas. En: Simposium Internacional de Brucelosis. Maracay, edo. Aragua. pp. 123.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA) (2007). La Brucelosis, Historia de la Enfermedad. [Artículo en línea] (Fecha de acceso: Mayo de 2007). Disponible en: http://senasicaw.senasica.sagarpa.gob.mx/portal/html/salud_animal/campanas_zoosanitarias/la_brucelosis.html

Serra A., J. y Godoy G., P. (2000). Incidencia, Etiología y Epidemiología de la Brucelosis en un Área rural de la Provincia de Lleida. Rev. Esp. Salud Pública., Ene-Feb. 74: 45-53.

Shurig, E.; Jones, L.M.; Speth, S.L. y Berman, D.T. (1978). Antibody Response to Antigen Distict from Smooth Lipopolysaccharide Complex in Brucella Infection. Infection an Inmunity. 21 (3): 994-1002.

Shurig, G. (1999). Erradicación de la Brucelosis y Características Principales de la Vacuna *Brucella abortus* cepa RB51. En: Simposium Internacional de Brucelosis. Maracay – Estado Aragua. pp 27-30.

Smits, H. L. y Kadri, M. (2005). Brucellosis in India: a deceptive infectious disease. Indian J. Med. Res. 122, Nov. pp 375-384.

Sieppel, J.E.; El-Masry, N.A. y Farid, Z. (1982). Diagnosis of Human Brucellosis with ELISA. Lancet. li: 19.

Sosa, G.; Comach, G.; Vásquez de Cedeño, A.; Pérez, F.; Mejías, B.; Ramírez, N.; Bandeira, E. y Polanco, J. (1998). Prevalencia de Anticuerpos contra *Brucella spp* en Trabajadores de Granjas Porcinas del Estado Aragua y su Relación con su Antigüedad Laboral y la Presencia de Clínica Sugestiva de Brucelosis. En: III Jornadas de Divulgación Científica "Dr. Witremundo Torrealba". Maracay-edo. Aragua. pp. 78-79.

Tuncer, S.; Akhan, S. y Hayran, M. (1999). A case of Chronic Peripheral Due to Brucella: Confirmed by Serology and PCR. [Artículo en línea] (Fecha de acceso: Mayo de 2007). Disponible en: <http://www.bilgi.umedica.orgtr/yayin/cr>.

Vasquez de Cedeño, A. y Méndez, M. (1987). Determinación de Anticuerpos de Brucella en el Personal que Labora en las Granjas Porcinas del Estado Aragua. Monografía. Universidad de Carabobo, Facultad de Ciencias de la Salud. Núcleo Aragua.

Vásquez De Cedeño, A. (1998). Situación Epidemiológica de la Brucelosis Humana en Venezuela 1994-1998. En: Instituto Nacional de Higiene Rfael Rangel. Instituto de Investigaciones Veterinarias y Dirección General de Epidemiología del M.S.A.S. Venesuela. s/p.

Vásquez De Cedeño, A.; Comach, G.; Sánchez De Porras, E. y Sosa, G. (1999). Aplicación de la Prueba de ELISA en el Diagnóstico de la Brucelosis en Personas Ocupacionalmente Expuestas. En: Simposium Internacional de Brucelosis. Maracay – Estado Aragua. pp 123.

Vásquez De Cedeño, A. y Sánchez De Porras, E. Diagnóstico Serológico de la Brucelosis por la Técnica de ELISA. Monografía. (1993). Universidad de Carabobo. Facultad de Ciencias de la Salud, Núcleo Aragua.

Velásquez, C. (1992). Prevalencia de la Brucelosis Caprina en el Municipio Autónomo Dabajuro del Estado Falcón. Trabajo de Grado para optar al título de Médico Veterinario no publicado. Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda. Coro, estado Falcón.

Velásquez M., O.J. y Vargas P., F. (2002). Situación Actual de la Brucelosis en México. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica/SSA.

Wallach, J.C.; Samartino, L.E; Efron, A. y Balde, P.C. (1997). Human Infection by *Brucella melitensis*: an Outbreak Attribut to Contact with Infected Goats. FEMS Inm. Med. Microbiol. Dec. 19 (4): 315-321.

Zheludkow, M.M.; Chernysheva, M.I.; Paulova, I. P.; Sulimanova, A. K.; Shchikova, N. N. y Perikopskii. Y.S. (1990). Specific Immunoglobulins of Different classes in Brucellosis in Human. Ter. Arkh. 62: 42-46.

ANEXOS

ANEXO 1
FICHA EPIDEMIOLÒGICA DE BRUCELOSIS HUMANA

CODIFICACIÒN: Estado:
Municipio:
Parroquia ò Sector:
Fundo:

FECHA: _____ **FICHA Nº:** _____

NOMBRE: _____ **SEXO:** ___ **EDAD:** _____

LUGAR DE HABITACIÒN: _____

OCUPACIÒN: _____

LUGAR DE TRABAJO: _____

TIEMPO DE SERVICIO: _____

ACTIVIDADES QUE REALIZA: _____

TRABAJOS ANTERIORES – LUGAR: _____

TIEMPO DE SERVICIO: _____

ACTIVIDADES QUE REALIZABA: _____

HA PRESENTADO FIEBRE EN LOS ÚLTIMOS SEIS MESES: SI: ___ NO: ___

¿POR CUÀNTO TIEMPO?: _____

OTROS SÌNTOMAS: **DOLOR DE CABEZA:** _____ **ESCALOFRÌOS:** _____

SUDORACIÒN: _____ **DEBILIDAD:** _____

PÈRDIDA DEL APETITO: _____

DOLOR EN LAS ARTICULACIONES: _____

OTROS: _____

OBSERVACIONES: _____

ANEXO 2



UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
NUCLEO ARAGUA



CONSENTIMIENTO INFORMADO

En la Universidad de Carabobo (Sede Aragua), actualmente se está realizando el proyecto de investigación titulado: “Determinación de la Infección por *Brucella* en Individuos Ocupacionalmente Expuestos a Ganado Caprino en Municipios del Estado Falcón”, con el objeto de estimar la frecuencia de individuos infectados por Brucelosis en dicha población.

La Brucelosis es una zoonosis que afecta una gran variedad de animales domésticos y silvestres. Con base a la marcada preferencia que expresan por el huésped animal se tiene que: *Brucella abortus* se asocia más con ganado bovino; *Brucella melitensis* con caprinos y ovinos, *Brucella suis* con suinos, *Brucella canis* con caninos, *Brucella ovis* con ovinos y *Brucella neotomae* con roedores. El riesgo que corre cualquier individuo de contraer la enfermedad y la severidad del padecimiento, están determinadas por las especies de *Brucella* a la cual el individuo se expone o se encuentra en contacto frecuente, el estado nutricional e inmunológico, la vía de infección y el tamaño del inóculo.

En cuanto a la vía de infección se considera que la más eficiente es el contacto con los productos del aborto del animal; además las bacterias pueden penetrar al hombre a través de la conjuntiva y/o piel maltratada, cortada o reblandecida. Igual magnitud de riesgo representan las vísceras, sangre y excretas de animales enfermos, que constituyen la forma de infección más común para veterinarios, ordeñadores así como trabajadores de mataderos. Por otra parte la vía digestiva es la generadora del mayor número de casos humanos reportados en varios países,

donde el consumo de leche y sus derivados sin pasteurizar; es una práctica muy común y ampliamente extendida.

Se debe sospechar de Brucelosis humana en todos aquellos individuos que presenten síntomas como fiebre, escalofríos, dolor de cabeza, sudoración nocturna, malestar general, debilidad; que provengan de zonas endémicas, que hubiesen consumido productos lácteos no pasteurizados o de origen dudoso y/o que hayan tenido contacto estrecho con animales de esas zonas.

Yo _____, portador de la Cédula de Identidad N° _____, domiciliado en mayor de edad en uno pleno de mis facultades mentales y sin ninguna coacción o violación alguna, declaro mediante la presente:

1. Haber sido informado de manera clara, objetiva y sencilla, sobre todos los aspectos relacionados con el presente proyecto de investigación, por parte del autor del mismo y coordinada por la Prof. (a) Clara Nancy Gutierrez, tutor científico del trabajo.

2. Tener conocimiento claro que el objetivo principal del estudio es: Determinación de Anticuerpos anti-*Brucella* en Individuos en Contacto con Ganado Caprino en Municipios del Estado Falcón.

3. Conocer el propósito experimental expuesto por las investigadoras, en el cual se establece que mi participación en el estudio consiste en permitir que me tomen una muestra sanguínea mediante la técnica de punción venosa, en la cara anterior del brazo izquierdo o derecho y la elaboración de una ficha epidemiológica con datos contentivos de interés para la investigación.

4. Que la información suministrada al equipo de investigación será utilizada para lograr el objetivo planteado, pero que me será garantizada confidencialidad relacionada tanto con mi identidad como con cualquier información relativa a mi persona.

5. Que bajo ningún concepto podré restringir el uso, para fines académicos, de los resultados obtenidos en el presente estudio.

6. Conocer que mi participación en el estudio no representa riesgo ni inconveniente alguno para mi salud.

7. Que bajo ningún concepto se me ha ofrecido, ni pretendo recibir beneficio de tipo económico, producto de los posibles hallazgos en el referido proyecto de investigación.

DECLARACIÓN DEL VOLUNTARIO

Luego de haber leído, comprendido y recibido las respuestas a mis preguntas con respecto a este formato de consentimiento, y por cuanto la participación en este estudio es completamente voluntaria, acuerdo:

- 1) Aceptar las condiciones estipuladas en el mismo y a su vez autorizar al equipo de investigación de la Universidad de Carabobo, Sede Aragua, realizar el referido estudio.
- 2) Reservarme el derecho de revocar esta autorización, sin que ello traiga algún tipo de consecuencia para mi persona.

Voluntario (a)	Investigadora
Firma: _____	Firma: _____
C.I.: _____	C.I.: _____
Lugar: _____	Lugar: _____
Fecha: ____/____/200__	Fecha: ____/____/200__

DECLARACIÓN DE LA INVESTIGADORA

Acto seguido de haber explicado claramente al voluntario la naturaleza del protocolo experimental a realizar y haber aclarado todas sus posibles dudas, certifico mediante la presente que a mi leal saber, el sujeto acepta, mediante este formulario de consentimiento, su participación consciente en el estudio y su compromiso con el mismo.

Lugar: _____ Fecha: ____/____/200__

Nombre de la Investigadora: _____

Firma de la Investigadora: _____

ANEXO 3

BUFFERS

1- Buffer para la inmovilización de reactivos a una matriz sólida.

Las soluciones "stock" se guardan a 4°C, pero se equilibran a temperatura ambiente antes de usar. Las dos soluciones "stock", se mezclan hasta alcanzar un pH de 9,6. El buffer puede ser guardado por una semana; sin embargo, se recomienda que se prepare fresco para cada uso de los dos buffers "stock". Este buffer es muy útil para inmovilizar lipopolisacáridos y otros polisacáridos.

2- Buffer utilizado para las etapas de lavado.

Mezclar el reactivo fosfato hasta alcanzar un pH de 7,2 y añadir el cloruro de sodio y el Tween 20. Mezclar bien. Este buffer puede ser guardado a temperatura ambiente por una semana (debe vigilarse el crecimiento bacteriano). Este es el más comúnmente utilizado.

3- Buffer utilizado para los sueros control y de prueba.

El EDTA y el EGTA es añadido al buffer fosfato ya preparado y el pH se ajusta con hidróxido de sodio 6M a 6,3. Este buffer es muy útil para la reducción de interacciones no específicas. Puede ser usado con 15mM de cada catión divalente. Todos los buffers conteniendo EDTA/EGTA parecen completamente estables y no soportan el crecimiento bacteriano. Almacenar a temperatura ambiente por varios meses.

4- Buffer sustrato.

Añadir agua destilada hasta completar 1L y chequear el pH. Este buffer se hace semanalmente, se guarda a 4°C y se debe equilibrar a temperatura ambiente antes de su uso. Se utiliza con la enzima de Rábano picante.

5- Solución sustrato/cromógeno.

Esta solución se prepara inmediatamente antes de usar. Se utiliza comúnmente como reactivo para la enzima peroxidasa.

ANEXO 4

REACTIVOS

BUFFER PARA LA INMOVILIZACIÓN DE REACTIVOS A UNA MATRIZ SÓLIDA.

- a) **Buffer Carbonato** (0,06 M; pH9,6)
- Bicarbonato de sodio (NaHCO_3)
 - Carbonato de sodio (Na_2CO_3)

BUFFER UTILIZADO PARA LAS ETAPAS DE LAVADO.

- a) **Buffer Fosfato** (0,01 M; pH 7,2 con cloruro de sodio y Tween 20)
- Fosfato ácido disódico (Na_2HPO_4)
 - Fosfato diácido de sodio (NaH_2PO_4)
 - Cloruro de sodio (NaCl)
 - Tween 20

BUFFER UTILIZADO PARA LOS SUEROS CONTROL Y DE PRUEBA.

- a) **Buffer Fosfato** (0,01 M; pH 7,2 con cloruro de sodio y Tween 20)
- b) **Buffer Fosfato** (0,01 M; pH6,3 con cloruro de sodio, Tween 20, 15mM de EDTA y 15mM de EGTA).

El mismo buffer de arriba.

- Sal disódica del ácido etilendiaminotetraacético
- Ácido tetraacético bis etilenglicol N,N, N',N' (β - éter aminoetil)
- Hidróxido de sodio (NaOH) (6 M).

BUFFER SUSTRATO.

- a) Buffer Citrato (0,05 M; pH 4,5).
- Ácido Cítrico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$)
 - Citrato Trisódico ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

SOLUCIÓN SUSTRATO/ CROMÓGENO.

- a) Buffer Citrato (0,05 M; pH4,5)
- b) Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2) (3%)
- c) ABTS (2,2 azinodi 3 ethylbenzothiazoline-6 sulfonic acid)

SOLUCIÓN SALINA FENOLADA.

- Fenol (C₆H₅OH) (0,5%)
- Cloruro de sodio (NaCl) (0,85% y 5%)

REACTIVOS BIOLÓGICOS.

- Suspensión antigénica al 11% de células intactas de *Brucella abortus* a pH 6,4.
- Suspensión celular al 8% pH 3,6.

ANTÍGENOS.

- Antígeno de Bang para (AT) (2%).
- Antígeno de 2-ME al 2%.